

**Bedeutung spinaler Prostaglandine für die zentrale  
Sensibilisierung bei akuter und chronischer  
Kniegelenksarthrititis bei Ratten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Katharina Nowak  
geboren am 14.02.1980 in Arnstadt

## Gutachter

1. Prof. Dr. Hans-Georg Schaible, FSU Jena
2. Prof. Dr. Hans-Christoph Scholle, FSU Jena
3. Prof. Dr. Karl Meßlinger, FAU Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.07.2015

## Abkürzungsverzeichnis

aqua dest.	destilliertes Wasser
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BK	Bradykinin
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CFA	complete Freud's adjuvans (Freud'sches Adjuvans), siehe auch FCA
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
COX-I	Cyclooxygenase-1
COX-II	Cyclooxygenase-2
DAG	Diacylglycerin
DMF	Dimethylformamid
DRG	Dorsal root ganglia (Spinalganglion)
DP	Prostaglandin D-Rezeptor
EAA	excitatory amino acids (exzitatorische Aminosäuren)
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EP	Prostaglandin E-Rezeptor
FCA	Freud's complete Adjuvans
FP	Prostaglandin F-Rezeptor
GABA	Gamma-Amino-Butter-Acid (Gammaaminobuttersäure)
h	Stunde
HT	high treshold (hochschwellig)
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IEG	immediate early gene (unmittelbar frühes Gen)
IL	Interleukin
IP	Prostaglandin I-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
i.p.	intraperitoneal
i.th.	intrathekal
i.v.	intravenös
K/C	Kaolin-Carragenan

KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
$K_i$	Inhibitionskonstante
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Neurokinin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NS	nozizeptiv spezifisch
NSAID	non steroidal anti-inflammatory drugs
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PG	Prostaglandin
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandin F <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> (Prostacyclin)
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PKA	Protein Kinase A
SDM	standard deviation of the mean (Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SP	Substanz P
TP	Thromboxan-Rezeptor
TRPV-1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
WDR	wide dynamic range

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
2.1	Einführung.....	4
2.2	Das nozizeptive System.....	5
2.2.1	Definition Schmerz und Nozizeption.....	5
2.2.2	Anatomisch-physiologische Grundlagen der Nozizeption.....	6
2.2.3	Innervation von Gelenken und sensorische Funktion nozizeptiver Afferenzen ..	7
2.3	Einfluss einer akuten peripheren Entzündung auf das nozizeptive System .....	9
2.3.1	Periphere Sensibilisierung.....	9
2.3.2	Zentrale Sensibilisierung.....	11
2.4	Cyclooxygenasen, Prostaglandine und NSAR .....	13
2.4.1	Vorkommen und Funktion der COX-Isoenzyme .....	13
2.4.2	Vorkommen und Regulation des COX-Prostaglandin-Systems in der Peripherie .....	17
2.4.3	Vorkommen und Regulation der COX-Expression im Rückenmark.....	19
2.4.4	Spinale Prostaglandine, Prostaglandinrezeptoren und Prostaglandineffekte .....	21
2.5	Einfluss einer chronischen Entzündung auf das nozizeptive System.....	26
2.6	Wirkungsweise der Prostaglandinsyntheseinhibitoren .....	29
2.7	Experimentelle Arthritismodelle .....	32
2.7.1	Modell der Antigen-induzierten Arthritis .....	32
<b>3.</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
4.1	Versuchstiere .....	35
4.1.1	Immunisierung und Induktion der Arthritis .....	35
4.1.2	Anfertigung der histologischen Präparate .....	35
4.2	Methode der extrazellulären Ableitung von Rückenmarkneuronen mittels Carbonfaserelektroden.....	36
4.2.1	Herstellung der Elektroden.....	36
4.3	Testsubstanzen.....	36
4.4	Versuchsvorbereitung.....	38
4.4.1	Narkose und Überwachung der Vitalparameter .....	38
4.4.2	Präparation der Tiere .....	38
4.4.3	Abgrenzung des abzuleitenden Gebietes.....	39
4.5	Versuchstechnik .....	39
4.5.1	Registrierung und Verarbeitung neuronaler Aktivität.....	39
4.5.2	Standardisierung der Reizapplikation .....	41
4.6	Versuchsablauf .....	41
4.6.1	Aufsuchen und Charakterisierung von Neuronen .....	41
4.6.2	Versuchsprotokolle.....	42
4.7	Auswertung und Statistik .....	44
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
5.1	Charakterisierung spinaler Neurone .....	45
5.1.1	Klassifikation und Lokalisation der Neurone.....	45
5.1.2	Rezeptive Felder.....	46

5.2	Bewertung der Arthritis anhand Gelenkumfang und Histologie.....	47
5.3	Einfluss der EP <sub>1</sub> -, EP <sub>2</sub> - und EP <sub>4</sub> -Rezeptor-Agonisten auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen im Verlauf einer Arthritis.....	49
5.3.1	Effekt der EP <sub>1</sub> -, EP <sub>2</sub> - und EP <sub>4</sub> -Rezeptor-Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	49
5.3.2	Effekt der EP <sub>1</sub> - EP <sub>2</sub> - und EP <sub>4</sub> -Agonisten am Tag 21 nach Arthritisinduktion...	51
5.4	Einfluss des EP <sub>3</sub> -Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen im Verlauf einer Arthritis.....	53
5.4.1	Effekt von ONO-AE-248 am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	53
5.4.2	Effekt von ONO-AE-248 am Tag 21 nach Arthritisinduktion.....	55
5.5	Einfluss des EP <sub>3</sub> -Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240 auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	57
5.6	Einfluss verschiedener COX-Hemmer auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen im Verlauf einer Arthritis.....	60
5.6.1	Effekt von Diclofenac und NS-398 am Tag 1 nach Arthritisinduktion .....	61
5.6.2	Effekt von Diclofenac, Indomethacin und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	63
5.6.3	Effekt von Diclofenac und NS-398 am Tag 21 nach Arthritisinduktion .....	67
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>
6.1	Selektivität der Prostaglandinrezeptoragonisten und -antagonisten sowie der COX-Inhibitoren .....	70
6.2	Präparation und Versuchsdurchführung .....	72
6.2.1	Standardisierung der Reizapplikation .....	73
6.2.2	Charakteristika der untersuchten Neurone .....	73
6.3	Arthritismodelle: Modell der Antigen-induzierten Arthritis .....	75
6.4	Bewertung der Arthritis anhand Gelenkumfang, Verhalten und Histologie .....	76
6.5	Einfluss von EP <sub>1</sub> -, EP <sub>2</sub> - und EP <sub>4</sub> -Rezeptor-Agonisten auf Hinterhornneurone im Verlauf einer Arthritis .....	78
6.5.1	Effekt des EP <sub>1</sub> -Rezeptor-Agonisten ONO-DI-004 .....	79
6.5.2	Effekt des EP <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonisten Butaprost .....	81
6.5.3	Effekt des EP <sub>4</sub> -Rezeptor-Agonisten ONO-AE1-329 .....	84
6.6	Einfluss des EP <sub>3</sub> -Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 und EP <sub>3</sub> -Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240 auf Hinterhornneurone im Verlauf einer Arthritis.....	85
6.7	Einfluss von unselektiven und selektiven COX-Inhibitoren auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen.....	93
6.7.1	Effekt von Diclofenac, Indomethacin und NS-398 im Verlauf der Arthritis....	100
6.8	Schlussfolgerungen.....	103
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
<b>ANHANG.....</b>		<b>130</b>
	Abbildungsverzeichnis.....	130
	Tabellenverzeichnis.....	131
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	132
	Danksagung.....	133

## 1. Zusammenfassung

Das Cyclooxygenase (COX-)-Prostaglandin-System steht schon seit vielen Jahrzehnten im Fokus der Untersuchungen zur Genese des Schmerzes. Elektrophysiologische Arbeitsmethoden bieten dabei eine exzellente Möglichkeit, physiologische und pathophysiologische Aspekte der Schmerzverarbeitung in vivo und in vitro zu untersuchen.

Im Allgemeinen unterscheidet man akute von chronischen Schmerzen. Während der akute Schmerz von kurzlebiger Natur ist und dabei die Signal- und Warnfunktion im Vordergrund steht, haben chronische Schmerzen häufig keine offensichtliche biologische Funktion. Häufig liegen persistierende pathologische Bedingungen zugrunde. Jedoch ist nicht immer ein kausaler Zusammenhang gegeben und es kann sich durch komplexe zelluläre Veränderungen ein eigenständiges Krankheitsbild entwickeln.

Die Beteiligung der Cyclooxygenasen und Prostaglandine an der Entstehung von Schmerzen ist im Allgemeinen akzeptiert. Neben dem sensibilisierenden Einfluss des COX-Prostaglandin-Systems auf periphere Nozizeptoren ist ebenfalls ein zentraler Effekt auf die Signaltransduktion nachweisbar. Spinale Prostaglandine scheinen maßgeblich an der Entstehung der zentralen Übererregbarkeit von Hinterhornneuronen zu Beginn einer Entzündung beteiligt zu sein. Jedoch ist ihr Einfluss auf die Aufrechterhaltung dieser zentralen Hyperexzitabilität bei weitem noch nicht vollständig geklärt. Besonders bei chronischen Entzündungsstadien sind die vorhandenen Daten noch recht unvollständig.

Für die vorliegende Arbeit wurden Experimente an insgesamt 42 männlichen WISTAR-Ratten durchgeführt. Die Daten wurden in vivo mittels extrazellulärer Ableitung von Hinterhornneuronen erhoben. Nach Induktion einer Antigen-induzierten Kniegelenksarthritis wurde das Entladungsverhalten der abgeleiteten Neurone mit Afferenz aus dem entzündeten Kniegelenk auf die spinale Applikation der einzelnen Testsubstanzen zu akuten (Tag 1 und 3) und chronischen (Tag 21) Entzündungsbedingungen quantifiziert. Dabei wurden die Rückenmarksneurone auf nicht noxische und noxische Reizung am Knie- und Sprunggelenk sowie an der Pfote getestet.

In unseren Experimenten galt zu klären, wie sich spinal applizierte EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten auf die Schmerzverarbeitung am Tag 3 und 21 nach Entzündungsinduktion auswirken. Des Weiteren untersuchten wir, inwieweit der EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE-248 die nozizeptive Signaltransduktion am Tag 3 und 21 nach AI-Induktion beeinflusst und wir verglichen das Antwortverhalten von Rückenmarksneuronen

auf spinal applizierte, unselektive COX-Inhibitoren (Indomethacin und Diclofenac) und den selektiven COX-2 Inhibitor (NS-398) am Tag 1, 3 und 21 nach Entzündungsinduktion. Damit einhergehend stellte sich die Frage, ob aus den erhobenen Daten Unterschiede der nozizeptiven Signalverarbeitung zwischen akuten und chronischen Entzündungssituationen abgeleitet werden können.

Es zeigte sich, dass spinal applizierte EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptoragonisten weder im Verlauf der akuten Arthritis (Tag 3) noch unter chronischen Bedingungen (Tag 21) eine Beeinflussung des Antwortverhaltens der getesteten Neurone bewirkte. Bezüglich des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 ließ sich zum Zeitpunkt einer fortgeschrittenen akuten Arthritis (Tag 3) keine Änderung der neuronalen Antworten auf Reizung des entzündeten Knies durch die spinale Applikation erzielen. Im Gegensatz dazu kam es zu einem deutlichen Abfall der Entladungen spinaler Neurone unter chronischen Entzündungsbedingungen (Tag 21). Bei der Testung der unselektiven und selektiven COX-Hemmer kamen wir zu dem Ergebnis, dass während der akuten Entzündung (Tag 1) nur der selektive COX-2 Inhibitor NS-398 die Antworten spinaler Neurone dosisabhängig reduzierte, nicht aber der unselektive COX-Hemmer Diclofenac. Drei Tage nach Arthritisinduktion zeigten keine der beiden COX-Hemmer einen Einfluss auf das Entladungsverhalten der Hinterhornneurone, während bei einer chronischen Entzündung (Tag 21) erneut nur der selektive COX-2 Hemmer NS-398 zu einer signifikanten Reduktion der Antworten auf Reizung des entzündeten Kniegelenkes führte. Die Anwendung von Diclofenac blieb wirkungslos.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich zum einen vermuten, dass die spinale Rezeptorausstattung sowie Enzymexpression des COX-Prostaglandin-Systems in Abhängigkeit vom Entzündungszeitpunkt einem dynamischen Wandel zu unterliegen scheint.

Zum anderen scheinen spinale Prostaglandine an der Entstehung zentraler Hyperalgesie und Allodynie beteiligt zu sein. So bewirkt bei naiven Tieren die spinale Applikation von PGE<sub>2</sub> oder EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Agonisten ein gesteigertes Entladungsverhalten spinaler Hinterhornneurone, wie es im Rahmen einer peripheren Entzündung der Fall ist. Umgekehrt führen unselektive und selektive COX-Hemmer zu einer reduzierten spinalen Hyperexzitabilität sobald sie vor und während der Entzündungsinduktion verabreicht werden. Allerdings scheint sich die Bedeutung spinaler Prostaglandine im Verlauf einer Entzündung zu ändern. Unter einer etablierten akuten sowie chronischen Entzündungssituation führt die Aktivierung von EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptoren zu keiner weiteren Aufrechterhaltung der spinalen Hyperexzitabilität, ebenso wie sich diese durch die Applikation von unselektiven COX-Hemmern nicht blockiert lässt. Somit scheinen spinale Prostaglandine an der



Aufrechterhaltung der zentralen Übererregbarkeit nicht beteiligt bzw. von untergeordneter Rolle zu sein. Dass jedoch der selektive COX-2 Hemmer zu einer reduzierten spinalen Hyperexzitabilität sowohl unter akuten als auch chronischen Entzündungsbedingungen führt, legt die Interaktion mit anderen zentralen Transmittersystemen nahe. Hinsichtlich dessen sind endogene Cannabinoide schon seit längerem in den Fokus der näheren Betrachtung getreten. Da unter akuten Entzündungsbedingungen ein Zusammenhang zwischen COX-2 Hemmung und Modulation des Endocannabinoidsystems mehrfach gezeigt werden konnte, sind gleichartige bzw. ähnliche Mechanismen unter chronischen Entzündungsbedingungen zu vermuten.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Einführung

Die europäische Schmerzstudie von 2003 hat gezeigt, dass 17 % der deutschen Gesamtbevölkerung von chronischen Schmerzen betroffen sind. Die damit verbundenen Kosten wurden auf rund 25 Milliarden Euro, welche v.a. durch Arbeitsunfähigkeit und Berentungen verursacht wurden, geschätzt (vgl. Internetreferenz I). Aktuelle Zahlen sprechen von 12-15 Millionen Menschen in Deutschland, die an chronischen, länger dauernden oder wiederkehrenden Schmerzen leiden, wovon 4-5 Millionen stark beeinträchtigt sind und sogar ein Viertel davon als Suizid-gefährdet eingestuft werden müssen (vgl. Internetreferenz II). Laut einer Hochrechnung einer Gruppe von Gesundheitsökonomen basierend auf einer Untersuchung im Jahr 2007, summieren sich allein die für Rückenschmerzen entstehenden volkswirtschaftlichen Kosten in Deutschland auf knapp 49 Mrd. Euro pro Jahr (vgl. Internetreferenz II). Vor diesem Hintergrund wird die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen der Schmerzentstehung und -chronifizierung deutlich.

In der Therapie akuter und zum Teil auch chronischer Schmerzen bilden nicht-steroidale Antirheumatika eine feste Basis. Trotz der bekannten und gefürchteten Nebenwirkungen sind sie eine der am häufigsten verschriebenen und gebrauchten Medikamente (Steinmeyer et al. 2000). Das Cyclooxygenase-Prostaglandin-System steht schon seit vielen Jahrzehnten im Mittelpunkt der Untersuchungen der Pathophysiologie des Schmerzes. Mit der Entdeckung der Prostaglandine in der menschlichen Samenflüssigkeit in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts durch Goldblatt und von Euler, der Klassifizierung dieser durch Bergström und Sjövall in den 60er Jahren sowie der Entdeckung des analgetischen, antipyretischen und antiinflammatorischen Effektes von Acetylsalicylat durch Vane und dessen Mitarbeiter begann die moderne Ära der Schmerzforschung (Steinmeyer 2000). Doch trotz des innerhalb der letzten Jahrzehnte angestiegenen Wissens über den Stellenwert der Prostaglandine bei der nozizeptiven Signaltransduktion, sind bei Weitem noch viele Fragen ungeklärt bzw. haben sich neue Fragen aus den erhaltenen Erkenntnissen ergeben. Elektrophysiologische Arbeitsmethoden bieten eine exzellente Möglichkeit, physiologische und pathophysiologische Aspekte der Schmerzverarbeitung in vivo und in vitro zu untersuchen. Dabei soll diese Arbeit anhand der Methode der extrazellulären Ableitung nozizeptiver Neurone des Rückenmarkes in vivo das Verständnis der zentralen Signaltransduktion auf Rückenmarksebene verbessern.

## Das nozizeptive System

### 2.1.1 Definition Schmerz und Nozizeption

Viele Erkrankungen teilen ein und dasselbe Korrelat: den Schmerz. Dabei erfüllt dieser v.a. die Funktion als Warnsignal des Körpers auf eine bestehende oder mögliche Beeinträchtigung eines Organs, Organsystems oder von Geweben.

Schmerzen lassen sich nach verschiedenen Faktoren, wie der Ätiologie, der Lokalisation oder der Dauer einteilen (Schaible & Schmidt 2007, Melzack et al. 2001). Die internationale Expertenkommission für Schmerzforschung (International Association for the Study of Pain, IASP) definiert Schmerz als ein *„unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“* (IASP 1979).

Schmerzen sind immer ein subjektives Erlebnis. Dabei ist die Schmerzempfindung ein kompliziertes Gefüge bestehend aus dem Auftreten eines schmerzhaften Stimulus, gefolgt von komplexen Verarbeitungsvorgängen im peripheren und zentralen Nervensystem. Hierbei lassen sich sensorisch-diskriminative, emotional-affektive, vegetative sowie motorische Komponenten abgrenzen. Schmerzen sind somit als eine vielschichtige integrative Antwort auf die Einwirkung gewebeschädigender Reize zu betrachten (Schaible 1997a). Damit es überhaupt zum subjektiven Sinneseindruck Schmerz kommen kann, ist ein Apparat aus Aufnahme, Weiterleitung und zentralnervöser Verarbeitung Voraussetzung. Diese sogenannte Nozizeption geht der Wahrnehmung, dem Bewusstwerden des Schmerzes voraus und wird definitionsgemäß von diesem abgegrenzt (Kidd & Urban 2001).

Generell ist der akute Schmerz von kurzlebiger Natur und lässt sich vom chronischen Schmerz abgrenzen. Während bei akuten Schmerzen die psychisch-affektive Signal- und Warnfunktion im Vordergrund steht, dienen chronische Schmerzen keiner offensichtlichen biologischen Funktion, lösen sich nicht spontan auf und zeichnen sich v.a. durch die Beeinträchtigung des Wohlbefindens und der Lebensqualität aus (Markenson 1996). Obwohl chronischen Schmerzen häufig persistierende pathologische Bedingungen zugrunde liegen, wie beispielsweise bei chronisch entzündlichen Gelenkserkrankungen, ist nicht immer ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Erkrankung und dem empfundenen Schmerz gegeben. So kann sich ein eigenständiges Krankheitsbild entwickeln, wo neben komplexen zellulären, molekularen und biochemischen Veränderungen auf peripherer und zentraler Signaltransduktionsebene (Schaible & Grubb 1993,Coderre et al. 1993) ebenso psychologische und soziale Einflussfaktoren über die Ausprägung und Dauer des Schmerzgeschehens mitentscheidend sind (Schaible & Vanegas 2000). Per se beschreiben

chronische Schmerzen also eher einen Zustand und sind nicht grundsätzlich für den klinisch tätigen Arzt ein Schlüssel zur Diagnose (Schaible & Schmidt 1996).

Ätiologisch betrachtet unterscheidet man zudem drei Arten von Schmerzen: den physiologischen, den entzündungsbedingten sowie den neuropathischen Schmerz (Riedel & Neeck 2001). Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt dabei auf dem entzündungsbedingten Schmerz.

### **2.1.2 Anatomisch-physiologische Grundlagen der Nozizeption**

Nach der Spezifitätstheorie ist der Schmerz eine eigenständige Sinnesmodalität und wird mit einem dafür spezialisierten nervösen Apparat von Sensoren, Leitungsbahnen und Zentren aufgenommen und verarbeitet (Schaible & Schmidt 1996, Melzack et al. 2001). Der Mensch verfügt über spezielle Sensoren, Nozizeptoren genannt, die, im gesamten Körper verteilt, schmerzhaft Reize aufnehmen und an höher gelegene Zentren weiterleiten. Die Nozizeptoren sind die peripheren Endigungen von primär sensorischen Nervenzellen, deren Perikaryen im Spinalganglion bzw. dem Ganglion trigeminale liegen und über Dendriten Kontakt ins Hinterhorn des Rückenmarks aufnehmen. Histologisch handelt es sich bei den Nozizeptoren um nichtkorpuskuläre, freie Nervenendigungen. Die meisten dieser freien Nervenendigungen sind polymodal, d.h. durch mechanische (Druck), chemischen (Entzündungsmediatoren) oder thermische Reize (Hitze, Kälte) aktivierbar.

Die an ihnen generierten Aktionspotentiale werden über afferente Nervenfasern der Gruppe III und IV zum Rückenmark weitergeleitet, um dann v.a. an Neuronen der Laminae I und II sowie IV-VI des Hinterhorns zu terminieren. Einzelne Neurone erhalten dabei nicht nur Eingang aus ein und demselben Organ oder Gewebe, sondern häufig konvergenten Einstrom aus der Haut und tiefen Geweben. Dies erklärt das Phänomen des übertragenen Schmerzes beispielsweise bei einer akuten Pankreatitis, bei der es durch freigewordene Verdauungsenzyme und der daraus resultierenden entzündlichen Alteration des umgebenden Gewebes zu den typischen gürtelförmigen Schmerzen im zugehörigen Dermatome des Oberbauches kommt.

Die synaptische Übertragung vom Nozizeptor auf das Hinterhornneuron erfolgt chemisch durch freigesetzte Neurotransmitter (v.a. Glutamat) sowie Neuropeptide. Umgekehrt haben einige Nozizeptoren neben ihrer afferenten sensorischen Funktion eine efferente sekretorische Funktion. Sie exprimieren verschiedene Neuropeptide, wie Substanz P, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Neurokinin A und Somatostatin, die bei vorheriger Aktivierung des Nozizeptors per axoplasmatischen Transportes in die peripheren aber auch zentralen

Endigungen transportiert werden (Schaible 1997b). Die dadurch in der Peripherie ausgelöste, so genannte neurogene Entzündung, zeichnet sich durch eine gesteigerte Gefäßpermeabilität, Vasodilatation sowie Plasmaextravasation aus und kann somit den entzündlichen Prozess unterhalten und zusätzlich verstärken (Lam & Ferrell 1991).

Von den zentralen Hinterhornneuronen ausgehend werden die Signale entweder direkt auf aufsteigende Bahnen (Tractus spinothalamicus, Tractus spinoreticularis, Tractus spinomesencephalicus) umgeschaltet oder über Interneurone in motorische (Wegzieh- und Stellreflexe/ Flexions- und gekreuzte Streckreflexe) oder vegetative (Herzfrequenzerhöhung, Schweißsekretion im Sinne einer Abwehrreaktion oder Schonhaltung) Reflexbögen eingebunden. Vom Thalamus, einer bedeutenden Schaltstelle der Schmerzverarbeitung, aus gelangen die Impulse in somatotoper Anordnung zum primären und sekundären somatosensiblen Kortex, Gyrus cinguli anterior, präfrontalen Kortex sowie Strukturen des limbischen Systems, wo es zur Bewusstwerdung, Differenzierung, Interpretation und Speicherung des Signals kommt.

Umgekehrt steht der nozizeptive Einstrom auf Rückenmarksebene unter dem Einfluss absteigender, diffuser und segmentaler Hemmsysteme (Cervero et al. 1991, Xian-Min & Mense 1990, Danziger et al. 1999). Ursprung der absteigenden, so genannten supraspinalen Hemmung, die über inhibitorische Transmitter (endogene Opiode, GABA, Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, u.a.) vermittelt wird, sind unter anderem Kerngruppen aus kortikalen Arealen sowie des Hirnstamms, namentlich des Nucleus raphe magnus, Locus coeruleus und des periaquäduktalen Graus). Via Interneurone sind sie in der Lage, die nozizeptive Information auf Rückenmarksebene zu unterdrücken (Basbaum & Jessell 1999).

### **2.1.3 Innervation von Gelenken und sensorische Funktion nozizeptiver Afferenzen**

Innerhalb des Gelenkes können drei verschiedene Nervenfasertypen identifiziert werden: myelinisierte und unmyelinisierte afferente Nervenfasern sowie unmyelinisierte efferente, sympathische Nervenfasern (Langford & Schmidt 1983). Elektronenmikroskopisch wurden davon etwa 20 % als myelinisierte und ca. 80 % als unmyelinisierte Fasern beschrieben, wobei ca. die Hälfte der unmyelinisierten Fasern sympathisch efferente Funktionen aufwies (Langford & Schmidt 1983, Hildebrand et al. 1991). Die Leitungsgeschwindigkeit hängt dabei vom Myelinisierungsgrad ab, wobei dick myelinisierte Fasern eine Konduktionsgeschwindigkeit von 20-65 m/s, dünn myelinisierte von 2,5-20 m/s und unmyelinisierte von 0,5-2m/s haben (Hildebrand et al. 1991).

Afferente Nervenfasern, die ihren Ursprung in DRG-Neuronen haben, werden generell anhand ihrer anatomischen und funktionellen Eigenschaften in 3 Hauptgruppen eingeteilt: in A $\beta$ -, A $\delta$ - und C-Fasern (Schaible & Grubb 1993). Während A $\beta$ -Fasern korpuskuläre Elemente als terminale Strukturen zur Reizaufnahme ausbilden, verfügen A $\delta$ - und C-Fasern über die schon erwähnten freien, nichtkorpuskulären Nervenendigungen und werden als die eigentlichen Nozizeptoren betrachtet (Schaible 1997b). Im Bereich von Gelenken wurden diese afferenten Nervenfasern in mehreren Strukturen identifiziert: im fibrösen Kapselapparat, Bändern, Menisken, Fettgewebe und Periost (Halata et al. 1984, Heppelmann et al. 1990).

Dick myelinisierte, schnell leitende A $\beta$ -Afferenzen sind v.a. durch nicht schmerzhafte, mechanische Reize, wie leichten Druck auf das Gelenk oder Bewegung des Gelenkes im normalen Arbeitsbereich, stimulierbar. Sie werden als niederschwellig mechanosensitive Rezeptoren („low threshold units“) bezeichnet und dienen v.a. der Propriozeption (Tiefensensibilität) (Schaible 1990). Sie tragen nicht zum Schmerz bei. Dünn myelinisierte A $\delta$ - und unmyelinisierte C-Fasern sind im Gegensatz dazu v.a. durch starken Druck oder Verdrehung des Gelenkes erregbar, im Sinne potentiell schmerzhafter oder gewebeschädigender Reize. Sie werden zu der Kategorie der hochschwellig mechanosensitiven Afferenzen („high threshold units“) gezählt und sind ihrem Entladungsverhalten nach nozizeptiv (Schaible & Schmidt 1983a, 1983b). Eine Aktivierung dieser Afferenzen führt zu einer schmerzhaften Empfindung.

Gesondert von den mechanosensitiven Nozizeptoren wurden ferner spezielle nozizeptive Afferenzen herausgefiltert, die weder durch nicht noxische noch durch noxische Stimulation erregbar waren (Schaible & Schmidt 1988). Diese primär mechanoinsensitiven Nozizeptoren werden deshalb auch als stumme Nozizeptoren („silent nociceptors“) bezeichnet. Sie verfügen meistens über Fasern der Gruppe C und zeichnen sich dadurch aus, dass sie erst im geschädigten oder entzündeten Gewebe aktivierbar sind (Schaible & Grubb 1993).

Die Gelenksafferenzen projizieren in die ihnen entsprechenden Rückenmarkssegmente. Hinterhornneurone erhalten dabei nicht nur aus einem Gelenk Eingang, sondern empfangen zusätzlich konvergent einfließende Information aus umgebenden tiefen Gewebsstrukturen (Muskeln, Bänder, Sehnen) und mitunter aus der Haut (Schaible et al. 1987a). Die nozizeptive Information wird dabei im Rückenmark ebenfalls von verschiedenen Neuronentypen bearbeitet. Rückenmarksneurone lassen sich bezüglich ihrer mechanischen Aktivierungsschwelle und ihres rezeptiven Feldes entweder als WDR (wide dynamic range)-Neurone oder als NS (nozizeptiv spezifische)-Neurone klassifizieren (Schaible & Grubb 1993). WDR-Neurone sind im Gegensatz zu NS-Neuronen durch mechanische Stimuli nicht

schmerzhafter und schmerzhafter Intensität aktivierbar und sind meist im tiefen Hinterhorn (Laminae V und VI) identifiziert worden (Schaible et al. 1987a, Neugebauer & Schaible 1990). Ihre Entladungsrate nimmt dabei mit steigender Intensität der Reizung am Gelenk zu. NS-Neurone, auch HT (high-threshold)-Neurone genannt, reagieren hingegen nur auf noxische Reizung von Gelenken und umgebenden Gewebe sowie schmerzhafte Bewegungen des Gelenkes entgegen der natürlichen Freiheitsgrade und konnten in der Ratte vornehmlich in den Laminae V und VI lokalisiert werden (Neugebauer et al. 1993). Beide Neurone projizieren entweder auf andere Neurone im selben Segment (Interneurone, Motorneurone) oder in aufsteigenden Bahnen zu supraspinalen Zentren der Schmerzverarbeitung.

## **2.2 Einfluss einer akuten peripheren Entzündung auf das nozizeptive System**

Am Beispiel einer akuten Gelenkentzündung soll in den folgenden Abschnitten die Vielzahl der molekularen und strukturellen Veränderungen auf peripherer und zentraler Verarbeitungsebene erläutert werden.

Eine akute sowie chronische Entzündung führt zu umfangreichen Veränderungen des Antwortverhaltens nozizeptiver Afferenzen und spinaler Neurone (Neugebauer et al. 1995). Neben den klassischen Zeichen einer Entzündung wie Rötung, Erwärmung, Schwellung sowie eingeschränkter Gelenkfunktion kommt es zu charakteristischen Veränderungen der Schmerzqualität. So werden zuvor als nicht schmerzhaft empfundene Reize als schmerzhaft empfunden (Allodynie) und es bildet sich eine allgemein gesteigerte Empfindlichkeit auf schmerzhafte Reize (Hyperalgesie) aus (Basbaum & Jessel 1999, Handwerker 1999). Pathophysiologisch beruht dies auf zwei entscheidenden Prozessen: der peripheren und zentralen Sensibilisierung. Sie sind Merkmale der Plastizität des neuronalen Systems und bedingen eine qualitativ und quantitativ veränderte Antworteigenschaft der Nozizeptoren und spinalen Neurone auf einen Entzündungsstimulus. Die verstärkte Schmerzempfindlichkeit ist in diesem sensibilisierten Zustand aber nicht nur auf den Ort der Schädigung beschränkt (primäre Hyperalgesie), sondern betrifft nun auch angrenzendes, nicht entzündetes Gewebe (sekundäre Hyperalgesie) (Basbaum & Jessel 1999, Urban & Gebhart 1999, Klein et al. 2004). Die sekundäre Hyperalgesie wird dabei durch zentrale Verarbeitungsvorgänge hervorgerufen.

### **2.2.1 Periphere Sensibilisierung**

Nozizeptoren eines gesunden Gelenkes reagieren aufgrund ihrer hohen mechanischen Aktivierungsschwelle nur auf intensive Reize, wie starken Druck oder Verdrehung des

Gelenkes (Schaible 1997b). Bei einer Entzündung ändert sich dies dramatisch, indem die Nozizeptoren eine gesteigerte Empfindlichkeit entwickeln (Basbaum & Jessel 1999).

Eine Entzündung führt nicht nur durch das entstehende Ödem und den Gelenkserguss zur vermehrten Nozizeptoraktivierung, sondern durch die Ausschüttung zahlreicher Entzündungsmediatoren kommt es zusätzlich zu einem veränderten chemischen Milieu (Schaible & Grubb 1993). In der Synovialflüssigkeit entzündeter, menschlicher und tierischer Gelenke konnten Prostaglandine, Bradykinin, Serotonin, Leukotriene, Histamin, Acetylcholin, Zytokine, Wasserstoffionen u.a. als solche identifiziert werden (Schaible und Grubb 1993, Basbaum & Jessel 1999, Zimmermann 2004). Sie interagieren mit spezifischen Rezeptoren an der sensorischen Endigung des Nozizeptors und aktivieren diese entweder direkt oder sensibilisieren sie für die Wirkung anderer Mediatoren (Honore et al. 1999). Zudem interagieren die Mediatoren untereinander und können sich in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken (Schaible & Grubb 1993). Mittels metabotroper Membranrezeptoren werden ferner second-messenger Kaskaden induziert, die über die Beeinflussung von Ionenkanälen zu einer Abnahme der Erregungsschwelle sowie zu einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz führen (Schaible & Richter 2004). Weiterhin sind während entzündlicher Prozesse sogenannte Neurotrophine (NGF-nerve growth factor) nachweisbar (McMahon & Bennett 1999). An Tyrosinkinaserzeptoren (TrkA-Rezeptor) bindend, bewirken sie längerfristig die Hochregulierung der Transkription für Membranrezeptoren und Neuropeptiden, wodurch die Sensibilisierung der Nozizeptoren unterhalten und verstärkt wird. So sind unter entzündlichen Bedingungen eine vermehrte Expression von Neurokinin (NK)-1- und Bradykinin (BK)-Rezeptoren (Petersen et al. 1998, Segond von Banchet et al. 2000) sowie eine gesteigerte Synthese von Substanz P (SP), Calcitonin gene-related Peptide (CGRP) (Lindsay & Hamar 1989, Segond von Banchet et al. 2003) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Michael et al. 1997) in sensorischen Neuron nachweisbar. Dabei verstärken die freigesetzten Neuropeptide SP und CGRP über den Mechanismus der neurogenen Entzündung die Vasodilatation und das Plasmaextravasat im Entzündungsgebiet. Dies unterhält einerseits das bestehende Ödem und somit den physikalischen Stress. Andererseits aktivieren sie direkt die periphere Endigung des Nozizeptors, stimulieren die Synthese anderer Entzündungsmediatoren, fördern die Histaminfreisetzung aus Mastzellen und potenzieren dadurch den Prozess der peripheren Sensibilisierung des Nozizeptors.

Das Resultat dieser funktionellen Änderungen ist am Antwortverhalten der Nozizeptoren ersichtlich. So zeigen die „low threshold units“ (dick myelinisierte A $\beta$ -Fasern) innerhalb der ersten Stunden nach experimenteller Arthritisinduktion ein verstärktes Antwortverhalten auf



nicht schmerzhaft stimuli. Dies wird begleitet von einer neu entstehenden Aktivierung der „high threshold units“ (dünn myelinisierte A $\delta$ - und unmyelinisierte C-Fasern) durch bereits leichte Druckreize, d.h. innoxische Reize. Zugleich reagieren primär mechanoinsensitive Afferenzen, die „silent nociceptors“, nun auf mechanische Stimulation des Knies und verstärken somit den afferenten Einstrom zum Rückenmark. Eine Induktion bzw. Zunahme von Ruheentladungen (Spontanaktivität), also Aktionspotentialen, die ohne willkürliche Applikation eines Reizes auftreten, ist ebenso nachweisbar (Neugebauer & Schaible 1988). Zusammengefasst tragen die herabgesetzte Erregungsschwelle, die gesteigerte Aktivität der sensibilisierten Nozizeptoren mit Spontanaktivität, die rekrutierten stummen Nozizeptoren sowie die neurogene Entzündung zu einem pathophysiologischen Einstrom nozizeptiver Signale ins Rückenmark und dadurch zur Sensibilisierung zentraler Neurone bei.

### 2.2.2 Zentrale Sensibilisierung

Kennzeichen der zentralen Sensibilisierung sind:

- eine herabgesetzte Aktivierungsschwelle
- ein verstärktes Antwortverhalten auf innoxische und noxische Reize
- eine Ausbreitung des Rezeptiven Feldes sowie
- eine Induktion oder Verstärkung der Spontanaktivität von zentralen Hinterhornneuronen.

Getriggert vom verstärkten Signaleinstrom der sensibilisierten Nozizeptoren des entzündeten Gelenks, ist die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Übererregbarkeit zentraler Neurone abhängig von prä- und postsynaptischen Prozessen. Präsynaptisch wird über die terminalen Endigungen der Nozizeptoren deren Sensibilisierung auf Reize in einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz, in einer vermehrten Freisetzung von Neurotransmittern und Neuropeptiden sowie einer gesteigerten Expression von deren Rezeptoren kodiert. Auf postsynaptischer Seite werden durch die vermehrte Ausschüttung von Neurotransmittern und -peptiden aus der präsynaptischen Endigung der Nozizeptoren ligandgesteuerte Ionenkanäle (NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren) sowie G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Neuropeptidrezeptoren, metabotrope Glutamatrezeptoren) aktiviert und dadurch das postsynaptische Neuron depolarisiert.

Von besonderer Bedeutung für die Signalübertragung sind die exzitatorischen Aminosäuren (EAA) Glutamat, Aspartat sowie die verschiedenen Neuropeptide SP, CGRP, NKA und BDNF. Glutamat ist als Haupttransmitter über die Aktivierung ionotroper NMDA- und non-NMDA (AMPA)-Rezeptoren sowie metabotroper Glutamatrezeptoren an der

postsynaptischen Membran zentraler Rückenmarksneurone in besonderem Maße an der Generierung und Aufrechterhaltung der zentralen Übererregbarkeit beteiligt (Neugebauer et al. 1993, Schaible & Schmidt 1996, Vetter et al. 2001). So bewirkt eine experimentell erzeugte periphere Entzündung die erhöhte intraspinale Freisetzung von Glutamat und Aspartat (Sluka & Westlund 1992, 1993; Sorkin et al. 1992). Dahingegen verhindert die spinale Applikation von NMDA- und non-NMDA-Rezeptor-Antagonisten sowie Antagonisten an metabotropen Glutamatrezeptoren die Entwicklung der Hyperexzitabilität zentraler Neurone und kann diese bei schon bestehender Sensibilisierung erheblich verringern (Neugebauer et al. 1993, 1994a, 1994b). Da der Ionenkanal von NMDA-Rezeptoren von einem  $Mg^{2+}$ -Ion blockiert wird, muss das Neuron für die Aktivierung dieser Rezeptoren ausreichend depolarisiert werden. Unter normalen Bedingungen werden suffiziente Depolarisationen der Rückenmarksneurone in der Regel erst durch noxische Stimulation von A $\delta$ - und C-Fasern oder unter pathophysiologischen, d.h. entzündlichen Bedingungen erreicht. Hingegen stimulieren innoxische Reize wie leichter Druck nur A $\beta$ -Fasern, die postsynaptische AMPA-Rezeptoren aktivieren. Diese sind ebenso durch noxische Stimuli erregbar und genauso wie NMDA-Rezeptoren unerlässlich für den Prozess der zentralen Sensibilisierung (Neugebauer et al. 1993).

Die verstärkte Entladungsrate der sensibilisierten Nozizeptoren mit konsekutiv gesteigerter Freisetzung von EAA und Neuropeptiden bedingt eine starke Depolarisation des postsynaptischen Neurons, wodurch die Blockade des NMDA-Rezeptors durch das  $Mg^{2+}$ -Ion aufgehoben und dieser für  $Na^{+}$  und  $Ca^{2+}$  durchlässig wird. Der durch die nun durchlässigen NMDA-Rezeptoren, aber auch über AMPA-Rezeptoren, metabotrope Glutamatrezeptoren sowie durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle vermittelte, erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Spiegel triggert eine Vielzahl von Prozessen. Zum einen werden über second-messenger Kaskaden Proteinkinasen (PKA, PKC) aktiviert, die, über Phosphorylierung ionotroper Rezeptoren, diese für weitere nozizeptive Signale sensibilisieren (Chen & Huang 1992, Yaksh et al. 1999, Fang et al. 2002, Kawasaki et al. 2004, McMahon & Jones 2004). Zum anderen werden durch phosphorylierte Enzyme verstärkt andere Transmitter (TM), wie Stickoxid (NO) und Prostaglandine (PG) freigesetzt, die ihrerseits den Prozess der zentralen Sensibilisierung forcieren (Gühring et al. 2001, Vetter et al. 2001). Die über die metabotropen Glutamatrezeptoren vermittelten Prozesse beinhalten ebenso second-messenger und Enzymkaskaden (IP<sub>3</sub>, DAG, cAMP, PKA, PKC, PLA, PLC) und sind fest in den Sensibilisierungsprozess eingebunden (Neugebauer 1994b).

Während die exzitatorischen Aminosäuren (EAA) v.a. für die schnelle synaptische Prozessierung von entscheidender Bedeutung sind, sind es Neuropeptide wie SP, CGRP, NKA, BDNF, die langfristig gesehen die synaptischen Übertragung beeinflussen. Sie werden bei Stimulierung des Nozizeptors vermehrt in den präsynaptischen Spalt freigesetzt und wirken über ihre entsprechenden Rezeptoren (Hanesch et al. 1993; Neugebauer et al. 1996a, 1996b; Segond von Banchet et al. 2000). Unter anderem verstärken sie die glutamaterge Signalübertragung an NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren (Dougherty & Willis 1991, Rusin et al. 1993, Ebersberger et al. 2000) sowie die Freisetzung von EAA (Kangra & Randic 1990). Dabei wird die Ausschüttung der Neuropeptide nicht nur durch die Aktivierung von Primärafferenzen hervorgerufen. Aus dem postsynaptischen Neuron diffundierendes NO scheint als „retrograder Transmitter“ das Freiwerden von Glutamat und Substanz P aus Primärafferenzen zu bewirken und somit die Übererregbarkeit spinaler Neurone voranzutreiben (Meller & Gebhart 1993, Gühring et al. 2001, Vetter et al. 2001). Des Weiteren ist langfristig eine gesteigerte Genexpression nachweisbar (Schaible et al. 2002). Besonders noxische Reizung unter pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel während einer peripheren Entzündung, führt zu lang anhaltenden molekularen Modifikationen in Rückenmarksneuronen. Sogenannte „immediate early genes“ (c-fos, c-jun, krox-24) beeinflussen die Transkription anderer Gene und somit die Synthese und Expression von Neurotransmittern, -peptiden sowie deren Rezeptoren (Basbaum & Jessel 1999, Zimmermann 2004).

Im Rahmen dieser aktivitätsabhängigen Veränderung der Erregbarkeit zentraler Hinterhornneurone werden langfristig funktionelle und strukturelle Veränderungen der spinalen Nozizeption gebahnt, die, werden sie nicht durchbrochen, in einer Chronifizierung des Schmerzgeschehens münden können.

## **2.3 Cyclooxygenasen, Prostaglandine und NSAR**

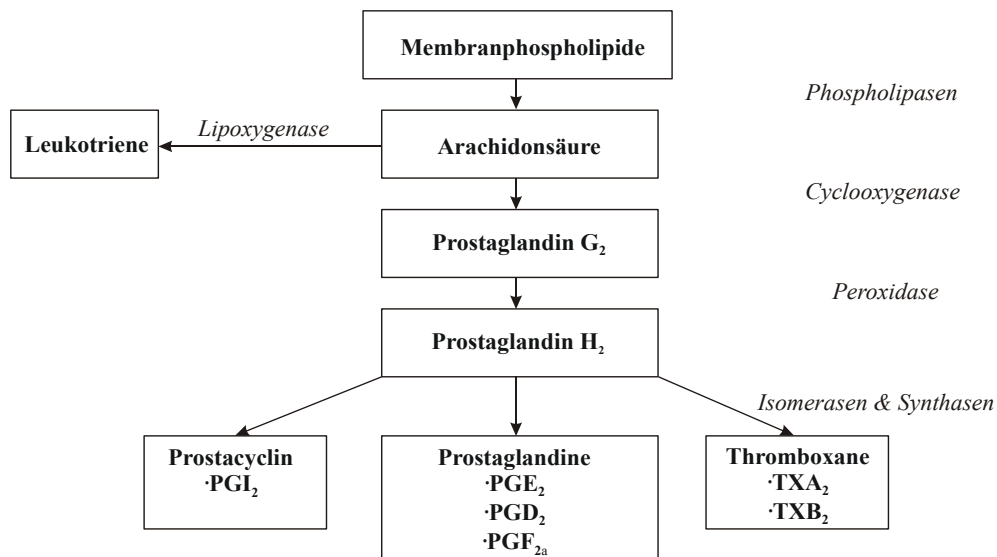
### **2.3.1 Vorkommen und Funktion der COX-Isoenzyme**

Die Cyclooxygenasen und Prostaglandine sind nicht nur bei einer Entzündung und der Entstehung von Schmerzen bedeutungsvoll, sondern erfüllen im gesamten Körper eine Vielzahl an Funktionen.

Nachdem man lange von der Existenz nur einer Cyclooxygenase (COX-1) ausgegangen war, konnte Anfang der 90er Jahre ein zweites, für die Bildung von Prostaglandinen verantwortliches Cyclooxygenaseenzym identifiziert werden: die Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Vane et al. 1998, Golden & Abramson 1999, Hinz & Brune 2002). Beide Enzyme werden

von zwei verschiedenen Genen auf Chromosom 9 und 1 kodiert (Kraemer et al. 1992). Und obwohl die Gene für beide Isoformen sehr verschieden sind (das COX-1 Gen ist 22 kb groß und das COX-2 Gen mit nur 8,3 kb ein „immediate early gene“ IEG), sind sich die Enzyme hinsichtlich Struktur und katalytischer Aktivität sehr ähnlich (Vane et al. 1998). Beide haben ein ähnliches Molekulargewicht von rund 70 kDa und eine in 60-63 % übereinstimmende Aminosäuresequenz (Vane et al. 1998, Schmidt & Geisslinger 2001). Das COX-2 Gen ist jedoch im Gegensatz zum COX-1 Gen weniger stabil (Golden & Abramson 1999). Ursache hierfür sind wahrscheinlich eine zusätzlich an der Promotorregion des COX-2 Gens vorhandene TATA-Sequenz sowie regulierende Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die empfindlich auf bestimmte entzündungsassoziierte Mediatoren wie cAMP-response element, NF- $\kappa$ B, Il-6-response element u.a. reagieren und dadurch potente Mechanismen zur Induktion der COX-2 Expression darstellen (Kraemer et al. 1992, Tazawa et al. 1994). Als IEG ist die COX-2 schnell induzierbar und in der Lage, direkt Zellfunktionen zu modifizieren (Golden & Abramson 1999, Kaufmann et al. 1996). In den letzten Jahren ist ein weiteres COX- Enzym entdeckt worden: die COX-3. Sie wird als Splicevariante der COX-1 angesehen und ist beim Kaninchen v.a. im zentralen Nervensystem identifiziert worden (Chandrasekharan et al. 2002, Schwab et al. 2003, Warner et al. 2004). Jedoch scheint die COX-3 weder beim Mensch noch bei Ratten und Mäusen exprimiert zu sein (Sang & Chen 2006).

Die mittels Phospholipasen aus Membransphospholipiden abgespaltene Arachidonsäure ist Ausgangssubstanz für die Synthese der Eicosanoide, zu denen die Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane zusammengefasst werden. Die PG-Synthase verfügt über zwei katalytische Aktivitäten: eine Cyclooxygenaseaktivität, die PGG<sub>2</sub> aus Arachidonsäure (AA) abspaltet und eine Peroxidaseaktivität, die das PGG<sub>2</sub> zu PGH<sub>2</sub> reduziert. PGH<sub>2</sub> ist dabei Edukt für eine Vielzahl zellspezifischer Synthetasen und Isomerasen, die die Umwandlung in die einzelnen Prostaglandingruppen (PGI<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>) sowie in die Thromboxane katalysieren.



**Abbildung 1:** Synthesewege der Eicosanoide (modifiziert nach Karow & Lang-Roth 2004).

Innerhalb der Prostaglandin-E<sub>2</sub> Synthasen (PGES) sind bisher 3 Enzyme bekannt, die PGH<sub>2</sub> zu E<sub>2</sub> formieren: 2 membrangebundene Formen – die mikrosomale PGES-1 und -2 (mPGES-1 und -2), sowie die zytosolisch vorhandene PGES (cPGES). Dabei ist die mPGES-1 v.a. an die COX-2 gekoppelt während die mPGES-2 mit der COX-1 assoziiert ist und die cPGES eine Kolokalisation mit der COX-1 und -2 aufweist (Sang & Chen 2006, Zeilhofer & Brune 2006). Grundsätzlich sind Prostaglandine chemisch und metabolisch sehr instabil, weshalb davon ausgegangen wird, dass ihre Wirkung lokal begrenzt ist (Narumiya et al. 1999, Narumiya & FitzGerald 2001).

Die konstitutiv in nahezu allen Zellen exprimierte COX-1 wird durch physiologische Stimuli aktiviert und ist, als ein so genanntes „house keeping enzyme“, an der Regulation physiologischer Homöostaseprozesse involviert (Golden & Abramson 1999, Hinz & Brune 2002, Svensson & Yaksh 2002). Die durch sie regulierten Prozesse dienen unter anderem der Integrität der Gastrointestinalschleimhaut, der Regulation der Nierendurchblutung, der Homöostase der Plättchenaggregation sowie der Induktion der Wehentätigkeit (Hinz & Brune 2002). Im Gegensatz dazu ist die COX-2 in geringerem Maße konstitutiv exprimiert. Sie wird jedoch v.a. im Rahmen entzündlicher Prozesse durch Entzündungsmediatoren (bakterielle Lipopolysaccharide, Zytokine wie Il-1, Il-2, TNF- $\alpha$ ) und durch die Zellaktivierung über Wachstumsfaktoren und Mitogene induziert (Tazawa et al. 1994). Hier ist sie v.a. an der Entstehung und Aufrechterhaltung von entzündlichen Reaktionen, Schmerzen und Fieber beteiligt (Hinz & Brune 2002). Ebenso scheint eine pathologisch erhöhte Expression der COX-2 eine Rolle bei der Karzinogenese bestimmter Tumoren (kolorektales Karzinom, Bronchial-, Mamma-, Pankreas-, Magen- und Prostatakarzinom), beim Morbus Alzheimer

sowie bei der Amyotrophen Lateralsklerose zu spielen (Vane et al. 1998, Golden & Abramson 1999, Hinz & Brune 2002, Maihöfner et al. 2003). Die früher gebräuchliche Einteilung in „COX-1 gut und COX-2 schlecht“ ist zu vereinfachend und bei weitem obsolet, da auch die COX-2 wie die COX-1 während physiologischer Adaptationsvorgänge aktiv zu sein scheint und nicht nur im Rahmen pathophysiologischer Vorgänge induziert wird (Schmidt & Geisslinger 2001). So ist sie ebenfalls im Rahmen der Wundheilung, im Salz- und Wasserhaushalt, bei Ovulation, Implantation und Weheninduktion, bei der endothelialen Prostacyclinproduktion oder beim Knochenstoffwechsel regulierend beteiligt (Harris et al. 1994, Vane et al. 1998, Golden & Abramson 1999, Hawkey 1999, Narumiya & FitzGerald 2001, Chen et al. 2002, Hinz & Brune 2002, Karow & Lang-Roth 2004).

Bezüglich der zentralnervösen Verteilung und Funktion ist das COX-Prostaglandin-System auch hier an zahlreichen Prozessen beteiligt. Da im Gegensatz zur Peripherie im ZNS beide COX-Isoformen konstitutiv exprimiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass die basale COX-PG-Aktivität in physiologischen Prozessen involviert zu sein scheint (Vanegas & Schaible 2001). Während die COX-1 in Neuronen des gesamten Gehirns identifiziert wurde, ist die COX-2 v.a. im Kortex, Mittelhirn, Hippocampus, Hypothalamus und Thalamus, Amygdala, Gyrus piriformis, in Hirnstammarealen und im Rückenmark nachgewiesen worden (Breder et al. 1995, 2004, Kaufmann et al. 1996, Vane et al. 1998, Samad et al. 2001, Vanegas & Schaible 2001, Zhu et al. 2003). Trotz der Verteilung der COX-1 im gesamten ZNS, scheint diese v.a. im Frontalhirn an der Integration komplexer Prozesse mitzuwirken (Vane et al. 1998). Nichtsdestoweniger ist jedoch v.a. die COX-2 in den letzten Jahren vermehrt ins Rampenlicht der Betrachtungen geraten. Neben der schon erwähnten Modulation zentral integrierter Schmerz- und Fieberprozesse, wird ihr nicht nur eine Beteiligung an physiologischen synaptischen Signaltransduktionketten zugeschrieben sondern auch an plastisch synaptischen Langzeitveränderungen und kognitiven Funktionen (Sang & Chen 2006). Erste Hinweise hierauf erbrachte die Arbeitsgruppe um Yamagata, die die Regulation der basalen COX-2 Expression durch eine NMDA-Rezeptor abhängige synaptische Aktivität beobachteten (Yamagata et al. 1993). Zudem zeigen Neurone in Kortex, Hippocampus und Amygdala eine Kolokalisation von Glutamat und COX-2 (Kaufmann et al. 1996), wodurch eine Einbindung der COX-2 in physiologisch synaptische Aktivitäten exzitatorischer Neurone impliziert wird. Gestützt werden kann diese Hypothese dadurch, dass sich die Expression von COX-2 mRNA entweder durch einen NMDA-Rezeptor-Antagonisten reduzieren bzw. durch hochfrequente elektrische Reizung hippocampaler Afferenzen, elektrisch ausgelösten Anfällen oder Schwimmstress erhöhen lässt (Kaufmann et al. 1996, Vane et al. 1998, Vanegas

& Schaible 2001). Im pathophysiologischen Funktionsbereich verdichten sich zunehmend die Hinweise, dass erhöhte COX-2 Expressionsmuster in neurotoxischen und neurodegenerativen Mechanismen und Erkrankungen, wie beim M. Alzheimer, bei epileptischen Anfällen, bei cerebralen Ischämien sowie bei NMDA-induzierter neuronaler Exzitotoxizität, involviert sind (Sang & Chen 2006).

Tabelle 1: Funktion der COX-Isoformen (modifiziert nach Vane et al.1998, Steinmeyer 2000, Hinz & Brune 2002, Sang & Chen 2006; LTP= Long Term Potentiation, LTD= Long Term Depression)

COX-1	COX-2	
„house-keeping enzyme“	Physiologische Funktion	Pathophysiologische Funktion
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plättchenaggregation (TXA<sub>2</sub>)</li> <li>- Gefäßendothel, Magen (PGI<sub>2</sub>)</li> <li>- Niere, Magen (PGE<sub>2</sub>)</li> <li>- ZNS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reninsekretion Niere</li> <li>- Wund-/ Ulkusheilung</li> <li>- Ovulation, Implantation, Weheninduktion</li> <li>- Knochenstoffwechsel</li> <li>- Gefäßendothel/ Vasoprotektion</li> <li>- ZNS (synaptische Plastizität-LTP, LTD, Kognition)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entzündung</li> <li>- Schmerz</li> <li>- Fieber</li> <li>- Karzinogenese</li> <li>- Neurotoxizität, Neurodegeneration (M. Alzheimer, Epilepsie, Ischämie)</li> </ul>

### 2.3.2 Vorkommen und Regulation des COX-Prostaglandin-Systems in der Peripherie

Wie bereits erläutert, werden bei einer lokalen Entzündung eine Vielzahl an entzündungsauslösenden und -unterhaltenden Mediatoren freigesetzt. Seitdem bekannt ist, dass Aspirin seine Wirkung über die Prostaglandinsynthesehemmung ausübt, ist die Beteiligung der Cyclooxygenasen und Prostaglandine an der Entstehung von Schmerzen, aber auch Fieber, Ödem und anderen Teilaspekten einer Entzündung allgemein akzeptiert (Minami et al. 2001, Stock et al. 2000).

Im entzündlich alterierten Gewebe findet sich sowohl beim Mensch als auch beim Tier eine verstärkte COX-2 mRNA Expression, wobei erhöhte Level in Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, Chondrozyten, Osteoblasten und Synovia festgestellt werden konnten (Sano et al. 1992, Crofford et al. 1994, Masferrer et al. 1994, McAdam et al. 2000, Hinz & Brune 2002, Ma & Eisenach 2002). Obwohl die COX-2 peripher im Entzündungsgebiet eine starke Induktion aufweist, scheint dies für die COX-1 nicht der Fall zu sein (Seibert et al. 1994, Samad et al. 2001).

Als Induktoren der peripheren COX-2 Expression fungieren v.a. entzündungsassoziierte Substanzen wie bakterielle Endotoxine, Interleukine (IL-1, IL-2, IL-6), Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  und Wachstumsfaktoren. Hemmend wirken antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13, ebenso wie Kortikosteroide (Crofford et al. 1994, Vane et al. 1998,

Alaaeddine et al. 1999). Die erhöhte COX-2 Expression wird dabei von einer vermehrten Prostaglandinsynthese begleitet. In Gelenksergüssen von Patienten mit entzündlichen Gelenkserkrankungen sowie in kultivierten Synoviazellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnten sämtliche Prostaglandine bzw. deren Abbauprodukte in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden (Robinson et al. 1975, Schaible & Grubb 1993, Wittenberg et al. 1993). Bei der Untersuchung von Gelenksflüssigkeiten und -geweben in experimentellen Arthritismodellen wurde ebenfalls eine gesteigerte Konzentration von Prostaglandinen gemessen.

Unter den Prostaglandinen werden v.a. Prostaglandin E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub> als proinflammatorische Prostaglandine angesehen und nehmen eine wichtige Rolle bei der nozizeptiven Informationsverarbeitung in der Peripherie sowie im ZNS ein (Yaksh et al. 1999, Zeilhofer & Brune 2006). Beide können periphere Endigungen nozizeptiver Primärafferenzen direkt aktivieren sowie für mechanische und chemische Stimuli sensibilisieren (Schaible & Schmidt 1988b, Birrel et al. 1991, Schepelmann et al. 1992, Kumazawa et al. 1993, Saito et al. 1995, Nicol et al. 1997, Vane et al. 1998). Dabei binden sie an der nozizeptiven Endigung an spezifische Rezeptoren, die, an G-Proteine gekoppelt, ihre Wirkung v.a. über aktivierte second-messenger Systeme ausüben. Resultat sind im Sinne einer peripheren Sensibilisierung eine gesenkte Erregungsschwelle, eine verstärkte Entladungsrate auf depolarisierende Reize, eine erhöhte Freisetzung von Neurotransmittern sowie eine Sensibilisierung der Nozizeptoren gegenüber anderen Substanzen, wie Bradykinin und Substanz P (Schaible & Schmidt 1988b, Levine et al. 1993, Schepelmann et al. 1992). Zudem ist Prostaglandin E<sub>2</sub> in der Lage, die Kalziumleitfähigkeit in kultivierten Spinalganglienzellen zu erhöhen, die Freisetzung von Substanz P und CGRP zu stimulieren sowie Kaliumkanäle zu hemmen, wodurch über die Beeinflussung der Erregungsschwelle zur Sensibilisierung beigetragen wird (Nicol et al. 1992, Hingtgen & Vasko 1994, Vasko et al. 1994, Nicol et al. 1996). Ein häufig verwandtes Modell zur Erforschung des Nozizeptors bieten dabei kultivierte Spinalganglienzellen, da davon ausgegangen wird, dass die Rezeptorexpression in DRG-Neuronen der der Nozizeptoren gleicht (Segond von Banchet et al. 2000).

Neben dem sensibilisierenden Einfluss des COX-Prostaglandin-Systems auf periphere Nozizeptoren, sind ebenfalls zentrale Wirkkomponenten nachweisbar, auf die in den folgenden Abschnitten eingegangen werden soll.



### 2.3.3 Vorkommen und Regulation der COX-Expression im Rückenmark

Unter normalen Bedingungen ließ sich in Dorsalganglienzellen sowohl COX-1 als auch COX-2 mRNA in vitro nachweisen (Inoue et al. 1999) wobei allerdings immunhistochemische Methoden nur die Darstellung von COX-1 Protein, nicht jedoch von COX-2 Protein ergaben (Willingale et al. 1997, Chopra et al. 2000). Die COX-1 ließ sich dabei in Zytoplasma, Kernmembran und axonalen Ausläufer der Dorsalganglienzellen nachweisen (Willingale et al. 1997).

Im Rückenmark hingegen wurden sowohl COX-1 und COX-2 mRNA als auch COX-1 und COX-2 Protein identifiziert (Beiche et al. 1996, 1998a, 1998b, Goppelt-Strübe & Beiche 1998, Hay et al. 1997, Hay & de Belleruche 1998, Resnick et al. 1998, Ebersberger et al. 1999, Tonai et al. 1999, Gühring et al. 2000, Zhu et al. 2003), welche auf zellulärer Ebene sowohl in neuronalen als auch nicht neuronalen Strukturen des ZNS nachweisbar waren (Vanegas & Schaible 2001, Svensson & Yaksh 2002, Ghilardi et al. 2004). Dabei sind im Rückenmark COX-2 positive Zellen besonders in den superfiziellen Laminae I und II, aber auch in den Laminae III-VI, X sowie in Motoneuronen des Vorderhorns vorhanden (Willingale et al. 1997, Beiche et al. 1998b, Goppelt-Strübe & Beiche 1998, Maihöfner et al. 2000). Besonders in der Kernmembran der Neurone, im Zytoplasma und rauen endoplasmatischen Retikulum wurde COX-2 Immunreaktivität (COX-2-li) gefunden, ebenso wie in Gliazellen der weißen Substanz (Beiche et al. 1998b, Maihöfner et al. 2000). Bezüglich der Verteilung der COX-1 im Rückenmark wurden verschiedene Beobachtungen gemacht: einerseits zeigte sich nur eine geringe COX-1-li in der grauen Substanz des Rückenmarkes, die auf einige wenige Fasern in der Eingangszone der Primärafferenzen sowie auf die oberflächlichen Laminae des Hinterhorns limitiert war (Willingale et al. 1997). Andererseits berichten Maihöfner et al. nur von einer COX-1-li in Gliazellen des Vorder- und Hinterhorns, nicht aber in Neuronen des Rückenmarkes. Und wiederum Zhu et al. identifizierten COX-1 Signale vereinzelt in Neuronen des Vorderhorns sowie intensiv in Gliazellen der weißen und grauen Substanz des Rückenmarkes (Zhu et al. 2003).

Betrachtet man nun den Expressiongrad beider Enzyme unter stimulierten Bedingungen, so wird v.a. die Expression der COX-2 mRNA und Protein im Rückenmark und in Dorsalganglienzellen beeinflusst. In Spinalganglienzellkulturen kann zum Beispiel durch den Zusatz des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  eine verstärkte Expression von COX-2 mRNA induziert werden (Inoue et al. 1999). Zum anderen kann mit Hilfe verschiedener experimenteller Manipulationen eine Induktion der COX-2 mRNA und Proteinexpression im Rückenmark stimuliert werden. Subkutan oder intraarteriell verabreichte Injektionen von

entzündungsauslösenden Substanzen wie Carrageenan (Ichitani et al. 1997, Ebersberger et al. 1999, Hay & de Belleruche 1997), kompletten Freud'schen Adjuvans (CFA) (Beiche et al. 1996, 1998a, Hay et al. 1997, Hay & de Belleruche 1998, Samad et al. 2001, Seybold et al. 2003) und Zymosan (Maihöfner et al. 2000, Gühring et al. 2000, Tegeder et al. 2001) führen zu einer Induktion von COX-2 mRNA und Protein sowohl ipsilateral als auch kontralateral des lumbalen sowie zervikalen Rückenmarkes. Resnick sowie Ghilardi et al. erhoben weiterhin einen Anstieg spinaler COX-2 mRNA und Protein nach traumatischer Gewebe- und Rückenmarksschädigung, wobei Zhao sowie Samad et al. konnten zusätzlich erhöhte COX-2 Level in Hypothalamus, Thalamus, Mittelhirn und Pons messen (Resnick et al. 1998, Ghilardi et al. 2004, Zhao et al. 2000, Samad et al. 2001). Daneben sind ebenso intravenös und intrathekal applizierte bakterielle Endotoxine (Svensson & Yaksh 2002), Zytokine wie IL-1 $\alpha$  und - $\beta$  (Tonai et al. 1999, Samad et al. 2001) und NMDA (Ghilardi et al. 2004) in der Lage, den Expressionsgrad spinaler COX-2 positiv zu beeinflussen. Die erhöhten Expressionsmuster konnten dabei in neuronalen und nicht neuronalen Strukturen wie Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen beobachtet werden (Bauer et al. 1997, Ichitani et al. 1997, Hirst et al. 1999, Ibuki et al. 2003, Ghilardi et al. 2004). Somit sind entzündliche Stimuli und traumatische Gewebsschädigungen mit den damit verbundenen zellulären (verstärkte Nozizeptoraktivität) und humoralen Mechanismen (proinflammatorische Substanzen) in der Lage, eine gesteigerte Expression der COX-2 im zentralen Nervensystem zu induzieren (Svensson & Yaksh 2002, Ibuki et al. 2003).

Bezüglich der Induzierbarkeit der COX-1 Expression ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen konnten weder in Dorsalganglien noch im Rückenmark eine verstärkte Expression von COX-1 mRNA und Protein unter akuten oder chronischen Entzündungsbedingungen feststellen (Beiche et al. 1996, 1998a, Hay et al. 1997, Hay & de Belleruche 1998, Goppelt-Strübe & Beiche 1998, Ebersberger et al. 1999, Inoue et al. 1999, Chopra et al. 2000, Seybold et al. 2003, Guay et al. 2004). Dahingegen zeigten Tonai und Gühring et al. eine leichte Zunahme der spinalen COX-1 mRNA Expression nach mechanischer Alteration des Rückenmarks bzw. nach Arthritisinduktion durch Zymosan (Tonai et al. 1999, Gühring et al. 2000) und Zhu et al. berichten ferner von einer Zunahme der Anfärbbarkeit für COX-1 im Rückenmark durch die Schnittein-zision der Pfote (Zhu et al. 2003).

### 2.3.4 Spinale Prostaglandine, Prostaglandinrezeptoren und Prostaglandineffekte

Cyclooxygenase formierte Prostaglandine spielen nicht nur auf peripherer Ebene eine wichtige Rolle; zahlreiche Untersuchungen konnten den Prostaglandinen ebenso eine Wirkung im ZNS nachweisen.

Wie bereits dargestellt, ist die Expression der COX-2 durch eine Vielzahl von Mechanismen induzierbar. Die gesteigerte Expression der COX-2 ist dabei mit einem Anstieg der spinalen PGE<sub>2</sub>-Freisetzung assoziiert, weshalb die COX-2 Aktivität auch als Quelle der vermehrten Prostaglandinsynthese angesehen wird (Hay et al. 1997, Vane et al. 1997, Hay & de Belleruche 1998, Ebersberger et al. 1999, Samad et al. 2001, Ibuki et al. 2003). Genauer betrachtet scheint der COX-2 abhängige PGE<sub>2</sub>-Anstieg sowohl peripher als auch spinal v.a. durch die mPGES-1 vermittelt zu sein, zeigt diese doch eine Kollokalisierung mit der COX-2 und wird ebenso durch entzündliche Stimuli in ihrer Expression hochreguliert (Guay et al. 2004, Zeilhofer & Brune 2006). Im Speziellen konnte durch schmerzhafte Hitzereize (Coderre et al. 1990), subkutane Applikation von Formalin (Malmberg & Yaksh 1995a, 1995b, Dirig et al. 1997, Muth-Selbach et al. 1999) und intraplantarer oder intraartikulärer Injektion von CFA, Carrageenan oder Zymosan eine vermehrte intraspinale Prostaglandin E<sub>2</sub>-Freisetzung gemessen werden (Yang et al. 1996, Hay et al. 1997, Hay & de Belleruche 1998, Ebersberger et al. 1999, Gühring et al. 2000, Samad et al. 2001, Vasquez et al. 2001, Nakayama et al. 2002, Guay et al. 2004). Ebenso lassen sich durch die intrathekale Administration von Substanz P und NMDA (Sorkin 1993, Hua et al. 1999) bzw. durch eine traumatische Rückenmarksschädigung (Tonai et al. 1999) die PGE<sub>2</sub> und I<sub>2</sub> Level erhöhen. In vitro Experimente an Rückenmarksfragmenten belegen ebenso eine gesteigerte Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und teilweise PGI<sub>2</sub> nach Zusatz von NMDA, SP oder Capsaicin (Malmberg & Yaksh 1994, Dirig & Yaksh 1999). Quelle der vermehrten Freisetzung können dabei Rückenmarksneurone, aber auch Gliazellen, Makrophagen, Endothelzellen und Primärafferenzen sein (Hay et al. 1997, Ichitani et al. 1997, Zhao et al. 2000, Ibuki et al. 2003).

Obwohl PG als Fettsäurederivate frei durch die Lipidmembran diffundieren könnten, scheinen aktive Transportmechanismen zum Ausschleusen aus der Zelle wahrscheinlicher zu sein (Svensson & Yaksh 2002). In den Extrazellularraum freigesetzt, üben sie ihre Wirkung über die Bindung an spezifische Rezeptoren aus. Diese Rezeptoren unterscheiden sich dabei in ihrer Gewebeverteilung, Signaltransduktionswegen und physiologischen Funktionen (Reinold et al. 2005). Alle Prostaglandinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsin Typ mit 7 transmembranären Domänen, wobei jeder Rezeptor von einem eigenen

Gen kodiert wird (Narumiya & FitzGerald 2001, Vanegas & Schaible 2001, Svensson & Yaksh 2002). Ihre Aktivierung triggert intrazelluläre Signale, die über die enzymvermittelte (Adenylatcyclase, Phospholipase C) Modulation von second-messengern (cAMP, Phosphoinositol,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen) in Abhängigkeit vom zugeschalteten G- Protein entweder stimulierend oder hemmend auf die weitere Informationsverarbeitung wirken (Narumiya et al. 1999). Die Rezeptoren für die jeweiligen Prostaglandine werden anhand ihres Liganden als EP-Rezeptoren (Ligand: Prostaglandin E), IP (Prostacyclin)-, DP (PGD)-, FP (PGF)- und TP (Thromboxan)-Rezeptoren benannt. Zudem konnten innerhalb der EP-Rezeptoren bisher vier verschiedene Haupttypen identifiziert werden: die  $\text{EP}_1$ -,  $\text{EP}_2$ -,  $\text{EP}_3$ - und  $\text{EP}_4$ -Rezeptoren. Fast alle Prostaglandinrezeptoren (IP, DP, FP,  $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_4$ ) sind an ein stimulierendes G-Protein ( $\text{G}_s$ ) bzw.  $\text{G}_q$ -Protein gekoppelt und bewirken intrazellulär erhöhte second-messenger Spiegel (cAMP,  $\text{PIP}_2$  mit DAG und  $\text{IP}_3$ ). Speziell der  $\text{EP}_3$ -Rezeptor nimmt eine Sonderstellung ein. Abhängig von der untersuchten Spezies (Mause, Ratte, Rinder Menschen), wird dieser nochmals in verschiedene Subtypen eingeteilt (Vanegas & Schaible 2001). So konnten zum Beispiel für die Maus bisher 3 Isoformen ( $\text{EP}_{3\alpha}$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ), 4 Isoformen für Ratten, 4  $\text{EP}_3$ -Isoformen für Rinder ( $\text{EP}_{3A}$ ,  $-\text{B}$ ,  $-\text{C}$ ,  $-\text{D}$ ) und 9 für den Menschen identifiziert werden (Negishi et al. 1995, Schmid et al. 1995, Beiche et al. 1998, Oldfield et al. 2001). Die Subtypen des  $\text{EP}_3$ -Rezeptors entstehen durch alternatives Splicen der RNA, was in wechselnden Sequenzen der Carboxylenden eines Rezeptors resultiert (Bos et al. 2004). Diese wiederum determinieren die Bindung an die verschiedenen G-Proteine. Aufgrund der verschiedenen Signaltransduktionsketten ist die Wirkung von  $\text{PGE}_2$ , im Gegensatz zu den anderen Prostaglandinen, breit gefächert aber auch gegensätzlich (Negishi et al. 1995).

Tabelle 2: Prostaglandinrezeptoren (modifiziert nach Narumiya et al. 1999, Tsuboi et al. 2002, Bos et al. 2004)

Rezeptor/ Rezeptorsubtyp	G-Protein	second messenger	Rezeptorisoformen
DP	$\text{G}_s$ , $\text{G}_q$	cAMP $\uparrow$ , $\text{Ca}^{2+}\uparrow$	Keine
EP			
• $\text{EP}_1$	nicht geklärt, bzw. $\text{G}_q$	$\text{Ca}^{2+}\uparrow$	2 (Ratte)
• $\text{EP}_2$	$\text{G}_s$	cAMP $\uparrow$	keine
• $\text{EP}_4$	$\text{G}_s$	cAMP $\uparrow$	keine
• $\text{EP}_3$	$\text{G}_i$ , $\text{G}_s$ , $\text{G}_q$ , $\text{G}_o$	cAMP $\downarrow\uparrow$ , $\text{PIP}_2$ mit DAG und $\text{IP}_3$	3 (Maus), 4 (Ratte), 4 (Rind), 9 (Mensch)
FP	$\text{G}_q$	$\text{PIP}_2$	2 (Rind)
IP	$\text{G}_s$ , $\text{G}_q$ , $\text{G}_i$	cAMP $\downarrow$ , $\text{PIP}_2$	keine
TP	$\text{G}_s$ , $\text{G}_i$ , $\text{G}_q$	cAMP $\uparrow\downarrow$ , $\text{PIP}_2$	2 (Mensch)

Bezüglich der Lokalisation ergaben in situ Hybridisationen und immunhistochemische Untersuchungen, dass DRG-Neurone (dorsal root ganglia, Dorsalganglien) jeden EP-Rezeptor (Donaldson et al. 2001) sowie IP-Rezeptoren exprimieren und im Rückenmark sämtliche EP- sowie IP- und DP-Rezeptoren präsent sind (Donaldson et al. 2001, Narumiya & FitzGerald 2001, Svensson & Yaksh 2002, Bär et al. 2004). Die Anwesenheit von DP-Rezeptoren in DRG-Neuronen ist unsicher (Vanegas & Schaible 2001).

Führt man sich nun die Verteilung der PG-Rezeptoren vor Augen, so ist von einer präsynaptischen sowie postsynaptischen Wirkkomponente der Prostaglandine auszugehen (Baba et al. 2001, Vasquez et al. 2001, Bär et al. 2004).

Prostaglandine sind im Zentralen Nervensystem an einer Reihe von physiologischen Funktionen, wie der Induktion von Fieber, der Sekretionsregulation von Vasopressin und luteinisierendem Hormon, der Modulation der Essensaufnahme und des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt (Sang & Chen 2006). Im Hinblick auf den Einfluss der Prostaglandine bei der Schmerzverarbeitung kommen zum einen in vivo und in vitro Experimente, zum anderen Verhaltensstudien mit Tieren zum Einsatz. Experimente an Dorsalganglienzellkulturen eignen sich besonders gut, um die an der Membran stattfindenden zellulären Phänomene zu studieren.

Generell betrachtet man Prostaglandin  $E_2$  und  $I_2$  als proinflammatorische und algetische Prostaglandine. So steigert  $PGE_2$  den  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (Nicol et al. 1992), hemmt, ebenso wie  $PGI_2$ , spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle (England et al. 1996, Evans et al. 1999) und erleichtert Tetrodotoxin-resistente  $Na^+$ -Einströme (England et al. 1996, Gold et al. 1996, Khasar et al. 1998, Gold 1999) in die Zelle. Dadurch bewirken sie eine gesenkte Erregungsschwelle sowie gesteigerte Entladungsraten in den Primärafferenzen, wobei wahrscheinlich entscheidend für die Wirkungen von  $PGE_2$  die second-messenger vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A und C ist (England et al. 1996, Gold et al. 1998, Evans et al. 1999). Vermutlich über die erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel sind Prostaglandine zusätzlich in der Lage, die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren (Glutamat, Aspartat), von Neuropeptiden (SP und CGRP) sowie NO aus Primärafferenzen und spinalen Neuronen zu ermöglichen (Nicol et al. 1992, Andreeva & Rang 1993, Hingten et al. 1994, 1995, Vasko et al. 1994, Vasko 1995, Sakai et al. 1998) und somit die Hyperalgesie zu verstärken (Malmberg et al. 1995c). Damit einhergehend fand die Arbeitsgruppe um Segond von Banchet, dass DRG-Zellen mit Zusatz von  $PGE_2$  vermehrt NK-1-Rezeptoren (Ligand: Substanz P) exprimieren, wodurch langfristig über die Beeinflussung von Rezeptorexpressionen mehr Primärafferenzen aktiviert und sensibilisiert werden und zum Prozess der zentralen

Sensibilisierung beigetragen wird (Segond von Banchet 2003). Zudem sind Prostaglandine fähig, die Wirkung anderer Entzündungsmediatoren, wie Bradykinin, zu potenzieren (Schaible & Schmidt 1988, Kumazawa et al. 1993) sowie andere Rezeptoren der Primärafferenz in ihrem Antwortverhalten auf Reize zu sensibilisieren. So vermögen PGE<sub>2</sub> und I<sub>2</sub> den Capsaicin-Rezeptor (TRPV-1), der normalerweise nur durch die algetische Substanz des Pfeffers Capsaicin, Protonen und thermische Reize ab 43°C aktiviert wird, durch die Senkung seiner Aktivierungsschwelle schon für Temperaturreize ab 35°C empfindlich zu machen (Moriyama et al. 2005). Zusammenfassend tragen all jene Prozesse zur Sensibilisierung des Nozizeptors bei und bewirken über einen pathophysiologisch erhöhten afferenten Signaleingang die Sensibilisierung zentraler Hinterhornneurone.

Neben der präsynaptischen Aktivität kann den Prostaglandinen auch ein direkter Einfluss auf Hinterhornneurone nachgewiesen werden. Mittels extrazellulärer Ableitung nozizeptiver Hinterhornneurone wurde festgestellt, dass spinal appliziertes PGE<sub>2</sub> die Entladungsraten postsynaptischer Neurone auf innoxische und noxische mechanische Reizung erhöht, zu einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes führt sowie die NMDA-induzierte Aktivität verstärkt (Vasquez et al. 2001). Damit im Einklang stehend sind die mittels patch-clamp Technik erhobenen Ergebnisse Babas et al., die eine direkte Depolarisation spinaler Neurone durch PGE<sub>2</sub> erzeugten (Baba et al. 2001). Verhaltensexperimente an Tieren mit experimentell ausgelösten Entzündungen bzw. unter dem Einfluss proinflammatorischer Substanzen konnten diese Beobachtungen bekräftigen. Herabgesetzte Aktivierungsschwellen, gesteigerte Entladungsraten und vergrößerte rezeptive Felder als Zeichen der peripheren und zentralen Sensibilisierung sind in einem sensibilisierten Verhalten auf normalerweise nicht schmerzhaft (Allodynie) und schmerzhaft Reize (Hyperalgesie) kodiert. So zeigen wache Tiere nach i.th. Applikation von PGE<sub>2</sub> Allodynie sowie mechanische und thermische Hyperalgesie (Uda et al. 1990; Minami et al. 1994a, 1994b, 1995, 2001; Malmberg & Yaksh 1995a, 1995b; Nishihara et al. 1995; Ferreira & Lorenzetti 1996; Turnbach & Randich 2002; Nakayama et al. 2004; Reinold et al. 2005). Intrathekal verabreichtes PGF<sub>2α</sub> ruft v.a. Allodynie (Minami et al. 1992) hervor, PGD<sub>2</sub> Allodynie sowie Hyperalgesie (Uda et al. 1990, Minami et al. 1994b). Bezogen auf die induzierten Signaltransduktionswege ist Prostaglandin E<sub>2</sub> ein Mediator pleotroper, teilweise gegensätzlicher Effekte, die von den exprimierten Rezeptorsubtypen abhängig sind (Bos et al. 2004). Wie bereits erläutert, führt zentral appliziertes PGE<sub>2</sub> zur zentralen Sensibilisierung, wie sie im Rahmen eines peripheren Entzündungsstimulus beobachtet wird (Vasquez et al. 2001). Um unterscheiden zu können, welcher der Prostaglandinrezeptoren die Wirkung von Prostaglandin E<sub>2</sub> vermittelt, gibt es

verschiedene experimentelle Ansatzpunkte. Zum einen lassen sich spezifische PG-Rezeptor-Agonisten und -antagonisten verwenden, wobei es jedoch v.a. an spezifischen Antagonisten mangelt. Zum anderen können Rezeptor-defiziente Tiere einen entscheidenden Beitrag zur Auflösung des Sachverhaltes leisten. Die Ergebnisse, die mittels jener Experimentenansätze gewonnen wurden, sind jedoch recht unterschiedlich.

In Verhaltensexperimenten zeigte sich bei der i.th. Applikation von verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten sowie bei Rezeptor-defizienten Tieren, dass wahrscheinlich die Aktivierung von EP<sub>1</sub>- und EP<sub>3</sub>-Rezeptoren an der Vermittlung der PGE<sub>2</sub>-induzierten Allodynie beteiligt ist, während die Hyperalgesie zusätzlich über aktivierte EP<sub>2</sub>-Rezeptoren ausgelöst zu werden scheint (Uda et al. 1990; Minami et al. 1994a, 2001; Nishihara et al. 1995; Nakayama et al. 2002, 2004; Reinold et al. 2005). Bär et al. kamen hingegen mittels elektrophysiologischer Experimente zu dem Ergebnis, dass die Aktivierung von EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptoren mittels spezifischer Agonisten unter normalen Bedingungen zu einer Reduktion der Aktivierungsschwelle mit gesteigerten Antworten auf noxische und nicht-noxische mechanische Stimulation, zu einer Verbreiterung des rezeptiven Feldes sowie teilweise zum Auftreten von Spontanentladungen spinal abgeleiteter Hinterhornneurone führt (Bär et al. 2004). Topisch auf das Rückenmark aufgebraachte EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten konnten somit die sensibilisierende Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf nozizeptive Rückenmarksneurone imitieren (Bär et al. 2004). Jedoch konnte Baba et al. 2001 mittels in vitro Experimenten nur für den EP<sub>2</sub>-Agonisten, nicht aber für die EP<sub>1</sub>- und EP<sub>3</sub>-Agonisten, einwärts gerichtete Membranströme erzeugen (Baba et al. 2001).

Einen anderen Wirkmechanismus postulierten Ahmadi et al., die von einer Hemmung inhibitorisch agierender, glycinergen Neurotransmission von Hinterhornneuronen ausgehen und PGE<sub>2</sub> so eine pronozizeptive Wirkung zeigt (Ahmadi et al. 2002).

Allerdings scheint sich die Bedeutung der verschiedenen PG-Rezeptoren im Verlauf eines Entzündungsstimulus zu verändern. Bei einer bereits bestehenden, akuten Entzündung wurde 5-10 h nach Arthritisinduktion durch K/C unter der topischen Applikation von Prostaglandin E<sub>2</sub> auf das Rückenmark keine weitere Verstärkung der Entladungen spinaler Neurone auf mechanische Stimulation des entzündeten Kniegelenkes beobachtet (Vasquez et al. 2001). Ebenso erwies sich unter den Prostaglandinrezeptoragonisten nur der EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist als wirksam, eine progressive Steigerung der Antworten auf mechanische Reizung zu stimulieren, nicht aber der EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Agonist (Bär et al. 2004). Interessanterweise war der EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE-248 in der Lage, die Entladungsrate hyperexzitabler spinaler Neurone dosisabhängig zu reduzieren, die Effekte von spinal aufgebrauchtem PGE<sub>2</sub> zu

antagonisieren sowie Prostaglandin  $E_2$ -verstärkte  $Na^+$ -Ströme zu minimieren (Bär et al. 2004). Demgegenüber berichtet Minami, dass i.th. verabreichtes ONO-AE-248 bei  $EP_3$ -Rezeptor-positiven Mäusen, nicht jedoch bei  $EP_3$ -Rezeptor-defizienten Mäusen, Hyperalgesie induzierte, wodurch eine Beteiligung des  $EP_3$ -Rezeptors an  $PGE_2$  vermittelter Hyperalgesie angenommen werden kann (Minami et al. 2001).

Zusammenfassend scheint während eines entzündlichen Prozesses v.a. die COX-2 und die mit ihr assoziierte mPGES-1 zur gesteigerten Prostaglandinfreisetzung und somit zur Entstehung von Hyperalgesie und Allodynie im Rahmen peripherer und zentraler Sensibilisierungsprozesse beizutragen. Es konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin  $E_2$  sowie  $EP_1$ -,  $EP_2$ - und  $EP_4$ - Agonisten in der Lage sind, ähnlich wie bei einer peripheren Entzündung, jedoch unter normalen Bedingungen den Status einer entzündungsinduzierten Hyperexzitabilität spinaler Neurone zu imitieren und zu induzieren (Vasquez et al. 2001, Bär et al. 2004). Allerdings ergeben die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen kein kohärentes Bild bezüglich der Bedeutung der verschiedenen EP-Rezeptoren für die zentrale Sensibilisierung. In Abhängigkeit des aktivierten G-Proteins scheint  $PGE_2$  entweder pronozizeptive oder antinozizeptive Eigenschaften aufzuweisen. Hier nimmt besonders der  $EP_3$ -Rezeptor eine Sonderstellung ein, an dem die große Bandbreite der teilweise gegensätzlichen  $PGE_2$ -vermittelten Wirkungen deutlich wird. Generell scheinen jedoch Prostaglandine eher an der Entstehung als an der Aufrechterhaltung der zentralen Hyperexzitabilität beteiligt zu sein (Vasquez et al. 2001).

## 2.4 Einfluss einer chronischen Entzündung auf das nozizeptive System

Eine einheitliche, eindeutige und allgemeingültige Definition für chronischen Schmerz lässt sich in der Literatur nicht finden. Im klinischen Alltag werden Schmerzen traditionell nach ihrer zeitlichen Komponente in akute und chronische Schmerzen untergliedert. Diesbezüglich variieren die Angaben mitunter erheblich. Bonica definiert einen Schmerz als chronisch, der länger als einen Monat über die normale Erkrankungsdauer bzw. Heilungsdauer einer Verletzung hinausgeht (Raspe et al. 2003). Die Quebec Task Force benutzt hingegen ein zeitliches Kriterium von 7 Wochen und andere definieren chronische Schmerzen als Beschwerden, die länger als 3 Monate oder für mindestens 3-6 Monate ununterbrochen bestehen (Raspe et al. 2003). Auch die IASP (International Association for the Study of Pain) gibt keine alleinige, allumfassende Definition für chronischen Schmerz sondern definiert diesen als Schmerz, der entweder länger als die normale Heilungsdauer anhält oder sprechen bei nicht tumorbedingten Schmerzen von 3 und im Forschungsbereich sogar von 6 Monaten



als Referenzzeitraum (Merskey & Bogduk 1994). Chronische Schmerzen allein nach ihrer zeitlichen Komponente zu definieren, steht dabei im Gegensatz zu ihrer multimodalen Genese sowie zum klinischen Outcome und erbrachte weder in der klinischen Praxis noch in der klinischen und epidemiologischen Forschung ein evidence-basiertes Klassifizierungssystem (von Korff & Dunn 2008). Vielmehr ist man im klinischen Alltag dazu übergegangen, von chronischen Schmerzsyndromen zu sprechen und diese einzeln zu klassifizieren. Desgleichen konnte die Grundlagenforschung bisher keinen klar definierten Zeitpunkt für den Übergang von einem akuten Schmerzgeschehen in ein chronisches liefern (Azad & Zieglängsberger 2003). Bezogen auf unser Experimentenmodell erscheint pathophysiologisch betrachtet eine akute Entzündung, als Grundlage eines solchen Schmerzereignisses, schon viel früher in eine chronische Entzündung überzugehen als oben genannte Zeitangaben.

Zum allgemeinen Verständnis des Lesers gehen wir im speziellen Fall der AI-Arthritis von einer akuten Entzündung im Zeitrahmen von 0-3 Tage nach Entzündungsinduktion, bei 4-7 Tagen von einer subakuten und ab dem 7. Tag von einer chronischen Entzündung aus. Histologisch betrachtet wird speziell die AIA im Zeitrahmen von 0-7 Tage post injectionem in eine akute und ab dem 7. Tag p.i. in eine chronische Arthritis unterteilt (Schurigt et al. 2005).

Die Entwicklung von chronischen Schmerzen ist mit aktivitätsabhängigen plastischen Veränderungen in nervalen Strukturen des peripheren und zentralen Nervensystems assoziiert (Schadrack et al. 1999). Generell konnte unter chronischen Entzündungsbedingungen eine erhöhte metabolische Aktivität im Rückenmark festgestellt werden (Schadrack et al. 1999). Bisherige Forschungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer experimentellen Arthritis ergaben, dass unter chronischen Bedingungen ähnliche Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit stattfinden wie unter akuten (Grubb et al. 1993, Hanesch et al. 1993, Neugebauer et al. 1994a, Schaible & Schmidt 1996, Schaible & Vanegas 2000). Ebenso wie bei einer akuten Entzündung besteht während einer chronischen Entzündung ein Status spinaler Übererregbarkeit (Menétrey & Besson 1982). So konnten Grubb et al. zeigen, dass es in allen von ihnen untersuchten Entzündungsstadien (2, 6, 13, 20 Tage nach Entzündungsinduktion durch FCA) zu einer Senkung der mechanischen Aktivierungsschwelle, zu einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes und zu einer erhöhten Anzahl spontanaktiver Neurone kam (Grubb et al. 1993). Dabei scheinen wiederum exzitatorische Aminosäuren von enormer Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung der Hyperexzitabilität zu sein, da NMDA- und non-NMDA-Rezeptor-Antagonisten unter akuten und chronischen Bedingungen (Tag 2 und 20 nach Arthritisinduktion) eine hemmende Wirkung auf die Antworteigenschaften zentraler Neurone haben (Neugebauer et al. 1994a, Schaible & Schmidt 1996). Im Allgemeinen

scheinen jedoch die einzelnen Transmitter-Rezeptorsysteme des Rückenmarkes einem Wandel bezüglich Expression, Synthese und Aktivität zu unterliegen, wobei im Folgenden auf das COX-Prostaglandin-System eingegangen werden soll.

Dem anfänglichen Peak der spinalen COX-2 Expression am Tag 1 (6 h) nach CFA-induzierter Arthritis folgt ein Abfall auf Ausgangswerte am 3. Tag, um zum 7. bzw. 22. Tag einen zweiten Höhepunkt zu erfahren (Beiche et al. 1998a). Das Expressionsmuster der COX-1 blieb dahingegen unbeeinträchtigt (Beiche et al. 1996, 1998a). Maihöfner et al. berichten ebenfalls von einem zweigipfligen Zuwachs COX-2 immunreaktiver Neurone im lumbalen Rückenmark 8 h sowie 4-7 Tage nach Zymosaninjektion, wo hingegen keine Zunahme COX-1 immunreaktiver Zellen zu verzeichnen war (Maihöfner et al. 2000). Die Arbeitsgruppe um Gühring untersuchte ebenfalls den Verlauf der COX-1 und -2 mRNA Expression und stellte einen Höhepunkt der spinalen COX-2 mRNA Expression ca. 4-6 h nach s.c. Injektion von Zymosan fest, woraufhin sich ein Abfall auf Ausgangswerte bis zum untersuchten Zeitpunkt von 7 Tagen anschloss. Auch hier veränderte sich das COX-1 Expressionsmuster nicht signifikant (Gühring et al. 2000). Bei CFA-induzierter Arthritis ließ sich eine maximale Induktion der spinalen COX-2 Expression 2-4 h nach Injektion beobachten, die 24 h später nahe und bis zum 7. Tag wieder auf Ausgangswerte fiel. Wiederum zeigte sich keine Induktion für die COX-1 (Hay et al. 1997). Neben einer erhöhten COX-2 mRNA Expression ließen sich in der gleichen Studie ein Anstieg des PGI<sub>2</sub> Abbauproduktes 6-keto PGF<sub>1α</sub> und von PGE<sub>2</sub> mit einem Maximum 8 h nach CFA-Injektion nachweisen, gefolgt von einem Abfall am 3. Tag und einem erneuten Zuwachs bis zum 7. Tag (Hay et al. 1997). In Untersuchungen von Dirig & Yaksh zur PG-Freisetzung nach K/C-induzierter Arthritis ergab sich ein stetiger Anstieg der PGE<sub>2</sub> Konzentration bis zum 3. Tag, ohne dass sich jedoch ein signifikanter Unterschied zum Basalwert am Tag 4 nach Injektion ergab (Dirig & Yaksh 1999). Nach Zymosaninjektion konnten Höchstwerte der PGE<sub>2</sub> Konzentration nach 6 bzw. 8 h beobachtet werden, die nach 7 Tagen wieder zu ihren ursprünglichen Werten abfielen (Gühring et al. 2000, Reinold et al. 2005).

Die Ergebnisse verdeutlichen eindrücklich, dass eine klare strukturierte Darstellung der stattfindenden Prozesse im Verlauf einer peripheren Entzündung durch eine Reihe von Umständen erschwert wird. Zum einen wurden verschiedene Entzündungsmodelle (CFA, Zymosan, K/C) verwendet, die wiederum individuelle Veränderungen der einzelnen Expressions- und Synthesemuster aufzuweisen scheinen. Zum anderen erfolgte die Datenerhebung zu unterschiedlichen Zeitpunkten und über keine einheitliche Zeitdauer, was die Vergleichbarkeit untereinander belastet. Da jedoch die Aktivität und Verteilung der

verschiedenen Prostaglandine und Prostaglandinrezeptoren von 3 wesentlichen Faktoren abzuhängen scheint, nämlich der Art des Schmerzes (entzündlich vs. neuropathisch), dem Ursprung der Sensibilisierung (peripher vs. zentral) und der Dauer des zugrunde liegenden Geschehens (akut vs. chronisch) (Zeilhofer & Brune 2006), ist eine systematische und exakte Aufschlüsselung der pathophysiologischen Mechanismen unter definierten Parametern für ein verbessertes Verständnis und der damit einhergehenden Möglichkeit, bestehende Behandlungskonzepte zu modifizieren, umso mehr erstrebenswert.

## **2.5 Wirkungsweise der Prostaglandinsyntheseinhibitoren**

Grundlage der bis heute geltenden Auffassung über die wesentliche Wirkungsweise der „Aspirin“-ähnlichen NSAIDs bildet der von Vane sowie Smith & Willis 1971 postulierte Mechanismus der Cyclooxygenasehemmung (Steinmeyer 2000, Schmidt & Geisslinger 2001, Hinz & Brune 2002). Dieser Durchbruch führte zur klassischen Hypothese, dass die Nicht-Steroidalen Antiphlogistika (NSAID, NSAR) ihre sowohl erwünschte antientzündliche und analgetische Wirkung als auch ihre unerwünschten Nebenwirkungen (gastrointestinale Ulcera und Blutungen, Nierenfunktions- und Thromozytenaggregationsstörungen u.a.) über die Hemmung der Prostaglandinsynthese ausüben (Golden & Abramson 1999). Als 1990 eine zweite COX-Isoform, die COX-2, entdeckt wurde, und 1994 Vane die Hypothese aufstellte, dass die selektive Blockade der COX-2 zur Schmerzreduktion und Entzündungshemmung führt, ohne die physiologischen COX-1 vermittelten Reaktionen zu beeinträchtigen, begann eine intensive Suche nach selektiven COX-2 Hemmern (Steinmeyer 2000). Schließlich können COX-Inhibitoren in vier Kategorien eingeteilt werden: in COX-unselektive (Ibuprofen, S-Ketoprofen, Flurbiprofen, Indomethacin, Piroxicam), COX-1 selektive (Aspirin, in experimenteller Anwendung SC 560), COX-2 präferentielle (Diclofenac, Meloxicam, Nimesulid) und COX-2 selektive Hemmer (Celecoxib, Rofecoxib, NS-398, L 745,33, SC 58125) (Lipsky et al. 1998, Hawkey 1999, Patrignani 2000).

Beide Isoenzyme besitzen einen hydrophoben, substratbindenden Kanal, an dessen Ende sich die Cyclooxygenaseaktivität befindet (Schmidt & Geisslinger 2001). Indem NSAIDs ungefähr in der Hälfte des Kanals an Stelle 120 an Arginin binden und somit den Kanal für Arachidonsäure blockieren, hemmen sie entweder zeitabhängig, langsam und reversibel (Indomethacin, Diclofenac, Flurbiprofen), kompetitiv, reversibel (Ibuprofen) oder irreversibel (Aspirin) die COX-Aktivität der PGH<sub>2</sub>-Synthetase, während die Peroxidaseaktivität unbeeinträchtigt bleibt (Hawkey 1999, Schmidt & Geisslinger 2001, Hinz & Brune 2002). Die Pharmakokinetik der selektiven COX-2 Inhibitoren ist langsam, zeitabhängig und irreversibel

(Hawkey 1999, Hinz & Brune 2002).

Die Selektivität der COX-2 Inhibitoren ergibt sich aus einem strukturellen Unterschied zwischen beiden Isoformen. Die Cyclooxygenase verfügt im Kanal zusätzlich über einen zweiten kleineren Kanal, dem so genannten „side pocket“, der jedoch bei der COX-1 an Stelle 523 durch das voluminöse Isoleucin verschlossen wird (Hawkey 1999). Bei der COX-2 befindet

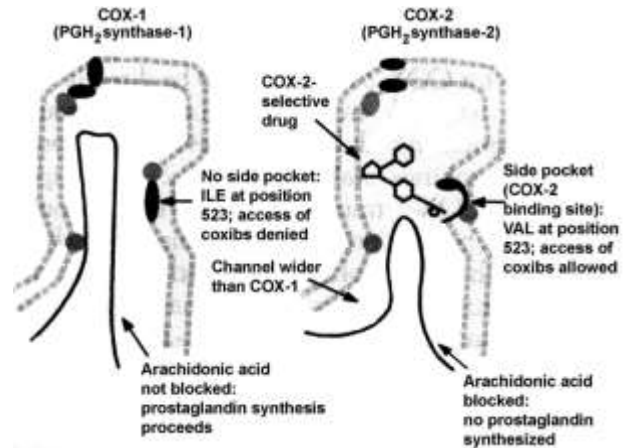


Abbildung 2: COX-1 und COX-2

sich stattdessen das kleinere Valin, wodurch ein Zugang zu diesem „side pocket“ gewährleistet wird. Die Bindung COX-2 selektiver Inhibitoren an dieses „side pocket“ ist wahrscheinlich für deren Selektivität verantwortlich (Hawkey 1999).

Im Laufe der Jahre wurde offensichtlich, dass NSAIDs nicht nur die Bildung peripherer proinflammatorischer Prostaglandine und somit die Sensibilisierung von Nozizeptoren im entzündeten Gewebe hemmen (Seibert et al. 1994, Rang et al. 1991), sondern auch im ZNS agieren (Ferreira et al. 1978). Generell können sowohl unselektive NSAIDs als auch selektive COX-2 Hemmer die neuronale Hyperexzitabilität reduzieren. Dabei jedoch entscheidend scheint der Zeitpunkt der Applikation zu sein. So bewirkt zum Beispiel die i.th. oder spinale Applikation von unselektiven COX-Inhibitoren (Ibuprofen, Indomethacin, Flurbiprofen) oder selektiven COX-2 Hemmern (Celecoxib, NS-398, SC-384, SC-58125, SC-236) vor Induktion einer Entzündung durch Formalin, Kaolin/Carrageenan, Zymosan, CFA bzw. durch traumatische Gewebealteration ein abgeschwächtes nozizeptives Verhalten (Malmberg & Yaksh 1992, 1995; Chapman & Dickenson 1992; Yamamoto & Nozaki-Taguchi 1996, 2002), eine verminderte mechanische und thermische Hyperalgesie (Dirig et al. 1998, Gühring et al. 2000, Yaksh et al. 2001, Vasquez et al. 2001, Ghilardi et al. 2004) sowie eine erniedrigte PGE<sub>2</sub>- und Neuropeptidfreisetzung in vivo und in vitro (Malmberg & Yaksh 1995, Smith et al. 1998, Southall et al. 1998, Dirig & Yaksh 1999, Geisslinger et al. 2000, Yaksh et al. 2001). Gleichsam konnte durch die i.th. Applikation von NS-398 und Indomethacin vor NMDA und AMPA Gabe, die dadurch normalerweise ausgelöste thermale Hyperalgesie gehemmt werden (Yamamoto & Sakashita 1998). Inhibition der COX-1 mit SC-560 erwies sich dahingegen als nicht effizient, Formalin-induziertes nozizeptives Verhalten (Yamamoto & Nozaki-Taguchi 2002) bzw. Carrageenan- und SP-induzierte thermale Hyperalgesie zu reduzieren (Smith et al. 1998, Yaksh et al. 2001). Genauso wenig beeinflusste die vorherige Gabe von SC-560 die

Entwicklung einer taktilen Allodynie und thermalen Hyperalgesie nach traumatischer Gewebeschädigung durch Kneifen und Quetschen der Haut (Ghilardi et al. 2004). Jedoch konnte mittels extrazellulärer Ableitung einzelner Hinterhornneurone festgestellt werden, dass die spinale Zugabe des selektiven COX-1 Inhibitors SC-560 vor Entstehung einer Arthritis durch K/C die Ausbildung der Übererregbarkeit in den ersten 1-2 h unterdrückt, danach aber die Antworten wieder auf Niveau einer Kontrollgruppe anstiegen (Telleria-Diaz et al. 2010).

Demgegenüber sind die Ergebnisse bei bereits bestehender Hyperexzitabilität postsynaptischer Neurone zu betrachten. Die spinale Anwendung unselektiver NSAIDs 6-11 h nach Arthritisinduktion durch K/C konnte die Entladungsrate extrazellulär abgeleiteter Neurone nicht vermindern. Erst die systemische Zugabe erwies sich als wirksam (Vasquez et al. 2001). Ebenso konnte keine Reduktion der thermalen Hyperalgesie durch i.th. verabreichtes Ibuprofen 2-3 h nach s.c. Injektion von Carrageenan erzielt werden (Dirig et al. 1998). Wiederum legten mehrere Arbeitsgruppen dar, dass erst die systemische Applikation unselektiver COX-Hemmer (Ketolorac, Ibuprofen, Diclofenac) eine Verminderung der K/C induzierten Hyperalgesie bewirkt (Zhang et al. 1997, Dirig et al. 1998, Ibuki et al. 2003).

Bezüglich der Wirksamkeit von COX-2 Hemmern nach Entzündungsinduktion, d.h. bei etablierter zentraler Hyperexzitabilität, ergaben sich divergente Meinungen. Elektrophysiologische Experimente konnten nicht nur die Wirksamkeit spinal aufgebrachter selektiver COX-2 Hemmer vor und während Arthritisinduktion belegen, sondern auch nach Arthritisinduktion eine dosisabhängige Reduktion der Antworten auf mechanische Reize erzielen (Telleria-Diaz et al. 2010). Ebenso berichten Ibuki et al., Yamamoto & Nozaki-Taguchi sowie Samad et al. in Verhaltensexperimenten von einer Reduktion der thermalen und mechanischen Hyperalgesie durch die i.th. Gabe des selektiven COX-2 Hemmers NS-398 2 h bzw. 48 h nach Arthritisinduktion, während Dirig et al. auf eine unveränderte thermale Hyperalgesie durch i.th. verabreichtes SC-58125 (COX-2 Hemmer) verweisen (Yamamoto & Nozaki-Taguchi 1997, Dirig et al. 1998, Samad et al. 2001, Ibuki et al. 2003). Spinal applizierte selektive COX-1 Hemmer hingegen, erwiesen sich als unwirksam, bei bereits bestehender Übererregbarkeit, diese zu hemmen bzw. zu reduzieren (Telleria-Diaz et al. 2010). Andererseits zeigte die Arbeitsgruppe um Zhu, dass in einem Tiermodell zur Untersuchung postoperativer Schmerzen (Inzision der Pfote) postoperativ und intrathekal verabreichtes SC-560 die entstandene Hyperalgesie dosisabhängig reduzieren konnte, während der selektive COX-2 Hemmer NS-398 unwirksam blieb (Zhu et al. 2003).

Die Ergebnisse betrachtend, lässt sich erkennen, dass die massive Induktion der COX-2 sowie die konsekutive Synthese von Prostaglandinen an der Etablierung des Schmerzes und der

zentralen Sensibilisierung zu Beginn einer Entzündung beteiligt sind. Ebenso scheint die COX-1 in den ersten 1-2 h der Entzündung eine Rolle bei der Synthese von Prostaglandinen und somit der Ausbildung eines übererregbaren Stadiums zu spielen, auch wenn verhaltensphysiologische Untersuchungen dies nicht belegen konnten. Die fehlende Wirkung unselektiver NSAIDs auf Hyperalgesie und Erregbarkeit der Neurone bei bereits bestehender Übererregbarkeit birgt die Annahme in sich, dass spinale Prostaglandine zumindest nicht im gleichen Maße an der Aufrechterhaltung der Hyperexzitabilität beteiligt zu sein scheinen wie an deren Entstehung. Die Tatsache aber, dass selektive COX-2 Inhibitoren die bereits bestehende Übererregbarkeit zentraler Neurone nicht nur reduzieren, sondern auch unterhalb der Grundaktivität absenken konnten, spiegelt zum einen die Komplexität der Prozesse wieder, zum anderen scheint die Hemmung der PG-Synthese durch selektive COX-2 Hemmer mit anderen Systemen der spinalen Schmerzverarbeitung zu interagieren und über Cyclooxygenase unabhängige Wege zur Analgesie beizutragen.

## **2.6 Experimentelle Arthritismodelle**

Um die neurobiologischen Grundlagen der Schmerzverarbeitung und den Einfluss zentral nervöser Mechanismen in deren Pathogenese aufzuklären, sind verschiedene Tiermodelle im Gebrauch.

Im Allgemeinen lässt sich durch physikalische, chemische, mechanische oder infektiöse Mechanismen eine periphere Entzündung bzw. Arthritis auslösen. So führt zum Beispiel die Injektion von Kristallen, wie Urat, Kaolin (Porzellanstaub) und Carrageenan (Algenextrakt) zu einer aseptischen Entzündung (Schaible & Grubb 1993). Entzündungsmodelle auf immunologischer Basis eignen sich besonders gut, die Auswirkungen einer akuten, besonders aber einer chronischen Entzündung auf die Schmerzverarbeitung zu studieren. Bekannt und bewährt haben sich hierbei v.a. die Adjuvans-induzierte Entzündung bzw. Arthritis durch s.c. Injektion von in Freund'schen Adjuvans (CFA-complete Freund's adjuvant) gelösten Mycobakterien sowie die Öl-, Antigen-, Kollagen-, Proteoglykan- oder Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis (Kunze 2002). Bis auf die Antigen-induzierte Arthritis, die eine Monoarthritis bedingt, führen die zuletzt genannten Modelle zur Ausbildung einer Polyarthritis.

### **2.6.1 Modell der Antigen-induzierten Arthritis**

Unter der Vielfalt der vorhandenen Arthritismodelle zur experimentellen Untersuchung von Aspekten wie Genese, Verlauf oder Therapie der Rheumatoiden Arthritis, hat sich unter

anderem das Modell der Antigen-induzierten Arthritis bewährt. Es spiegelt in vielen Gesichtspunkten den Entzündungsprozess der Rheumatoiden Arthritis beim Menschen wieder (Segond von Banchet et al. 2000). 1962 erstmals beim Kaninchen von Dumonde & Glynn etabliert, wird heute häufiger das später beschriebene Modell der Maus (Brackertz et al. 1977) oder der Ratte (Jacobs et al. 1988, Griffiths et al. 1992) gebraucht.

Zunächst wird die Ratte zweimalig mit subkutan appliziertem, in kompletten Freund'schen Adjuvans gelöstem, methyliertem Rinderserumalbumin (mBSA) immunisiert. Die kationische Substanz mBSA bindet dabei an den negativ geladenen Knorpel (Bendele 2001). Die darauf folgende Antikörperproduktion kann durch zusätzliche intraperitoneale Injektionen mit inaktivierten Bakterien, wie zum Beispiel *Bordetella pertussis*, verstärkt werden (Hunneyball et al. 1986). Nach der Immunisierung wird nun, durch eine einmalige Injektion des vorher verwendeten Antigens mBSA in den Gelenkspalt des zu untersuchenden Gelenkes, eine akute Entzündung erzeugt. Hierbei bilden die injizierten Antigene mit den vorab gebildeten Antikörpern Immunkomplexe und lösen durch Komplementaktivierung die Entzündungsreaktion aus (Crossley et al. 1989). Histologisch imponiert in der akuten Phase der Entzündung eine granulozytäre Infiltration der Synovialis und des Gelenkspaltes (Segond von Banchet et al. 2000). Die dabei sezernierten Zytokine und Enzyme bewirken die Hemmung der Proteoglykansynthese und den Abbau von Knorpelkollagen (Steinberg et al. 1979). Bereits nach 2 Tagen lässt sich der Knorpelabbau registrieren (van den Berg et al. 1982), ist zu diesem Zeitpunkt aber noch reversibel.

Für die Ausbildung einer chronischen Entzündung scheint unter anderem die durch Methylierung erreichte positive Ladung des BSA und dadurch wiederum verstärkte Retention des Antigens im avaskulären sowie hypovaskulären Gelenksstrukturen verantwortlich zu sein (van den Berg et al. 1982, 1984). Charakteristisch für den chronischen Entzündungsprozess sind eine Anhäufung von mononukleären Leukozyten im synovialen und subsynovialen Gewebe sowie eine starke Synovialzellhyperplasie (Pannusbildung) (Kunze 2002). Der Pannus ist eine Art bösartiges, zell- und gefäßreiches Granulationsgewebe, das nicht, wie im Fall einer einfachen Verletzung von Haut- Weichteilen, zu einer Wiederherstellung der Integrität und Funktion des Gewebes beiträgt, sondern durch sein aggressives Wachstum mit bindegewebigen und später knöchernen Umbau des Granulationsgewebes eine Arrosion und Destruktion des Knorpels und darunter liegenden Knochens mit konsekutiver Funktionseinschränkung des betroffenen Gelenkes bewirkt (Thomas 1993).

### 3. Ziel der Arbeit

Aus den einführenden Bemerkungen geht hervor, dass das spinale Cyclooxygenase-Prostaglandin-System, insbesondere die COX-2 und die durch sie formierten Prostaglandine, während peripherer entzündlicher Vorgänge eine Induktion erfährt und für die zentrale Schmerzentstehung und -verarbeitung eine entscheidende modulatorische Rolle einnimmt. Dabei scheinen spinale Prostaglandine maßgeblich an der Entstehung der zentralen Übererregbarkeit zu Beginn einer Entzündung beteiligt zu sein. Ihr Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Hyperexzitabilität ist jedoch bei weitem noch nicht aufgeklärt. Besonders bei chronischen Entzündungsstadien sind die vorhandenen Daten noch unvollständig. Angesichts der zahlreichen chronischen Schmerzpatienten ist aber gerade hier die Erforschung der pathophysiologischen Mechanismen sowie die Entwicklung bzw. Weiterentwicklung daraufhin abgestimmter Therapieschemata wünschenswert.

Im Speziellen wurde in der hier vorliegenden Arbeit folgenden Fragen nachgegangen:

- Wie verhalten sich spinal applizierte EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten auf die Schmerzverarbeitung am Tag 3 und 21 nach Entzündungsinduktion?
- Lässt sich für den EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ebenso eine hemmende Wirkung auf die nozizeptive Signalverarbeitung bei einer fortgeschrittenen akuten (Tag 3) sowie chronischen Entzündung (Tag 21) feststellen?
- Wie wirken sich spinal applizierte unselektive (Indomethacin und Diclofenac) und selektive COX-2 Inhibitoren (NS-398) auf das Antwortverhalten von Rückenmarksneuronen in der Initialphase einer akuten Entzündung (Tag 1), zu einer fortgeschrittenen akuten Entzündung (Tag 3) und unter chronischen Entzündungsbedingungen (Tag 21) aus?
- Können aus den erhobenen Daten Unterschiede der nozizeptiven Signalverarbeitung zwischen akuten und chronischen Entzündungssituationen abgeleitet werden?

Die vorliegende Arbeit wurde in vivo an männlichen Ratten durchgeführt. Anhand extrazellulärer Ableitung von Hinterhornneuronen mit Afferenz aus dem entzündeten Kniegelenk wurde deren Verhalten auf die spinale Applikation der einzelnen Testsubstanzen quantifiziert. Die jeweiligen Versuchsprotokolle sind im Abschnitt Material und Methoden nachlesbar.



## 4. Material und Methoden

### 4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche WISTAR-Ratten aus der Zucht des Institutes für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen (12/12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, Temperatur: 22 $\pm$  2°C, relative Luftfeuchte: 50  $\pm$  10 %) in Plastikschalen in Gruppen bis zu 4 Tieren. Zur Fütterung erhielten die Ratten Trockenpellets (Altromin, #1326, Lage, Germany) und Leitungswasser ad libitum.

#### 4.1.1 Immunisierung und Induktion der Arthritis

Insgesamt wurden für die Versuche 42 Ratten verwendet. Die 4-8 Monate alten Tiere wurden am Tag 21 und 14 vor Arthritisinduktion mit jeweils in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,5 ml kompletten Freund'schen Adjuvans (Sigma) [2mg/ml Mycobacterium tuberculosis Stamm H37RA (Difco, Detroit, MI, USA) ] gelösten 0,5 mg methyliertem bovinem Serum Albumin (mBSA; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) subkutan paravertebral in Höhe Th<sub>1</sub>-Th<sub>5</sub> immunisiert. Zusätzlich zu jeder Immunisierung wurde eine weitere intraperitoneale Injektion mit 2x10<sup>9</sup> hitzeinaktivierten Bordetella pertussis-Keimen (Krankenhaus Berlin-Friedrichshain, Pertussis-Referenzlabor, Berlin, Deutschland) vorgenommen, um die Antikörperproduktion zu verstärken. An den Stellen der Immunisierung entwickelte sich ein im Durchschnitt ca. 1 cm großes, verdicktes, derbes Gewebe, welches frei beweglich vom Untergrund war.

Unter Äthernarkose wurde durch eine einmalige intraartikuläre Injektion von 0,5 mg mBSA in 50  $\mu$ l 0,9 %iger NaCl-Lösung in das linke Kniegelenk die Arthritis induziert (Tag 0).

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt, wobei wir das Antwortverhalten extrazellulär abgeleiteter Rückenmarksneurone auf nicht noxische und noxische Reizung des Knie- und Sprunggelenkes sowie der Pfote am Tag 1, 3 und 21 nach der Induktion der Arthritis untersuchten.

#### 4.1.2 Anfertigung der histologischen Präparate

Von 3 Tieren mit einer chronischen Entzündung (21 Tage) wurden stichprobenartig histologische Schnitte angefertigt, um den Grad der Entzündung beurteilen und kontrollieren zu können. Die entnommenen Kniegelenke wurden von der Haut befreit, in 4%igem Formalin

fixiert, mit EDTA entkalkifiziert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden sie in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

## 4.2 Methode der extrazellulären Ableitung von Rückenmarkneuronen mittels Carbonfaserelektroden

Mit Hilfe einer extrazellulär gelegenen Elektrode lassen sich Aktionspotentiale von Nervenzellen ableiten. Die Spitze der Elektrode befindet sich hierbei nahe am Neuron und es werden Änderungen des elektrischen Feldes gemessen, die durch Ionenströme ausgelöst werden. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus und kann auch Aktionspotentiale im µV Bereich messen. Zudem gestattet sie dem Untersucher Ableitungen von Neuronen in vivo.

### 4.2.1 Herstellung der Elektroden

Für die extrazelluläre Ableitung der Hinterhornneurone wurden glasisolierte Carbonfaserelektroden mit einem Widerstand von 10-20 MΩ verwendet. Ein an einem Goldstecker angelöteter Silberdraht wurde mittels Silberleitlack mit der Carbonfaser verbunden. Zur Isolierung der Carbonfaser wurde diese zusammen mit dem Silberdraht in ein Glasröhrchen (Borosilikatglas, Typ 1103244, Hilgenberg, Malsfeld) eingeführt und an dessen Ende mit dem Goldstecker durch handelsüblichen Zweikomponentenkleber zusammen geklebt. Durch ein Elektrodenziehgerät (Nachbau: Narashige, Tokyo) wurden diese Rohlinge bis auf einen Spitzendurchmesser von ca. 5 µm verschmälert, indem das Glas geschmolzen und durch einen Elektromagneten auseinander gezogen wurde. Unter mikroskopischer Sicht (100-300-fache Vergrößerung) wurde das überstehende Ende der Carbonfaser bis kurz vor die Spitze des Glasröhrchens mit einer Kaliumdichromat angereicherten 0,1 M Schwefelsäure-Lösung und einer angelegten Spannung von 25-35 V abgeätzt.

## 4.3 Testsubstanzen

Für die spinale Anwendung kamen folgende Substanzen zum Einsatz:

- **EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-DI-004** in einer Konzentration von 100 ng/µl, gelöst in 5% DMSO und 0,9% NaCl (ONO Pharmaceutical, Osaka, Japan)
- **EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist Butaprost** (9-oxo-11α, 16R-dihydroxy-17-cyclobutyl-prost-13 E-en-1-oic acid, methyl ester) in einer Konzentration von 100 ng/µl, gelöst in 5% DMSO und 0,9% NaCl (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)

- **EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE1-329** in einer Konzentration von 100 ng/μl, gelöst in 5% DMSO und 0,9% NaCl (ONO Pharmaceutical, Osaka, Japan)
- **EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE-248** in einer aufsteigenden Konzentration von 1, 10 und 100 ng/μl, gelöst in 5% DMSO und 0,9% NaCl (ONO Pharmaceutical, Osaka, Japan)
- **EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist ONO-AE3-240** in aufsteigender Konzentration von 1, 10 und 100 ng/μl, gelöst in 5% DMSO und 0,9% NaCl (ONO Pharmaceutical, Osaka, Japan)
- **Indomethacin**, unselektiver COX-Hemmer, (1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure) 8 mM, gelöst in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH, Aqua dest, NaCl, HCl (pH:7,5) (Calbiochem, La Jolla, USA)
- Vehicle für Indomethacin (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17,65 mM NaOH, 63,4 mM NaCl, 5 mM HCl)
- **Diclofenac**, unselektiver COX-Hemmer, ([2-(2,6-Dichloranilino)phenyl]essigsäure) in 3 mM iger Verdünnung, gelöst in Ethanol und Tyrode (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
- **NS-398**, selektiver COX-2-Hemmer (N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methansulfonamid) 1.3 mM, gelöst in Dimethylformamid (DMF) und Aqua dest (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
- **Methanandamid**, CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist, ((R)-N-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-eicosatetraenamid) 100 nM, gelöst in Ethanol und Tyrode (Tocris Cookson Limited, Bristol, UK)
- **Tyrodelösung** (127,8 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 9 mM CaCl, 2,1 mM MgCl, 9,8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,15 mM NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Aqua dest.; pH 7,3)
- Heparin-Tyrode-Lösung 1 I.E. zum Füllen des Venenkatheters
- Thiopental (0,2 g Thiopental in 1,7 ml Aqua dest.)

Zum Verdünnen der Substanzen wurde destilliertes Wasser verwendet. Alle Substanzen wurden in einer definierten Menge von 50 μl in den Rückenmarkspool gegeben und bei sichtbarem Verlust in das umliegende Gewebe nachappliziert.

## **4.4 Versuchsvorbereitung**

### **4.4.1 Narkose und Überwachung der Vitalparameter**

Zur Narkoseeinleitung von Ratten werden normalerweise 85-125 mg/kg Körpergewicht Thiopental (Trapanal, Byk Gulden, Konstanz; mit Aqua bidest. gelöst) intraperitoneal appliziert. Wahrscheinlich aufgrund der bestehenden Kniegelenksentzündung reagierten die Tiere viel empfindlicher auf das Narkosemittel, weshalb wir zur Einleitung der Narkose die Dosis reduzierten. Aufmerksam auf diesen Umstand wurden wir, als uns zu Beginn der Experimentenserie ein Tier bei der Narkoseeinleitung verstarb.

Unter der angepassten Dosis waren alle Tiere spontanatmend. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde anhand der Atemfrequenz- und -tiefe, erloschenen Kornealreflexen und Wegziehreflexen des Hinterlaufes und der Reaktion auf schmerzhaftes Pressen des Schwanzes (Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Wegziehbewegung des Beines) überprüft. War diese nicht garantiert, wurden entsprechend 5-10 mg Thiopental i.p. nachinjiziert und die Narkose somit vertieft. Die Temperatur wurde kontinuierlich mittels rektal eingeführtem Thermofühler überwacht und durch eine an ein Feedbacksystem angeschlossene Thermofolie auf physiologischen Werten ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) gehalten.

### **4.4.2 Präparation der Tiere**

Zuerst wurden die Ratten am Rücken im LWS Bereich sowie am Hals mit einem elektrischen Rasierer rasiert. Durch einen Ventralschnitt von der Incisura jugularis sterni bis etwa Höhe Os hyoideum wurde die Trachea freigelegt und nach einer Trachetomie mit einer kleinen Palstikkanüle kanüliert. Um die Sauerstoffsättigung zu verbessern, wurde Sauerstoff mit einem Fluss von 1 l/min in die Nähe der Kanülenöffnung geleitet. Danach wurde die Vena jugularis interna aufgesucht und katheterisiert. Via eines dort platzierten, zentralen Venenkatheters erfolgte am Ende des Experiments die Applikation einer letalen Dosis Thiopental (1 ml  $\cong$  120 mg).

Als nächstes wurde durch einen Hautschnitt im thorako-lumalen Bereich die Wirbelsäule freigelegt. Nach Entfernung der paravertebralen Muskulatur wurde das Tier in einem stereotaktischen Rahmen mit Hilfe von unter den Prozessii transversii angebrachten Schwanenhalsklemmen fixiert. Daraufhin wurde die Laminektomie durchgeführt und überstehende Haut am Rahmen festgebunden. Unter mikroskopischer Sicht (M5A, Wild, Heerbrugg, Schweiz) wurde die Dura mater mit einer Vannas-Schere (Geuder, Heidelberg) entfernt und so das Rückenmark freigelegt.

#### 4.4.3 Abgrenzung des abzuleitenden Gebietes

In dem Bereich zwischen Arteria spinalis posterior und dem Eintritt der Hinterhornwurzel in Höhe der Segmente L<sub>1</sub>-L<sub>4</sub> wurde nun mittels einer Carbonfaserelektrode das Ableitgebiet wie folgt festgelegt. Die unter mikroskopischer Sicht auf das Rückenmark aufgesetzte Elektrode wurde durch einen elektrischen Schrittmotor (SMS 87. TC Elektronik Würzburg) in  $\mu$ m-Schritten durch das Rückenmark bewegt. Simultan dazu wurde das entzündete Kniegelenk durch leichtes bis moderates Pressen in der mediolateralen Achse stimuliert. Hatte man das Gebiet mit Signaleinstrom von Nervenafferenzen aus dem ipsilateralen Kniegelenk lokalisiert, wurde ein dünnwandiger, ovaler Plastikring (ca. 3x5 mm) zur Abgrenzung des abzuleitenden Gebietes auf das Rückenmark gelegt und mit Agar/Silikongel auf der Oberfläche befestigt. Um das angrenzende Gewebe vor Austrocknung zu schützen und zu stabilisieren, wurde es mit Agar (2,5 %ig, Fluka, Deisenhofen) bedeckt. Durch den Plastikring und den aufgetragenen Agar wurde so ein definierter Pool von ca. 30-50  $\mu$ l geschaffen und das Abfließen von Substanzlösungen weitestgehend verhindert.

#### 4.5 Versuchstechnik

##### 4.5.1 Registrierung und Verarbeitung neuronaler Aktivität

Abbildung 1.1. veranschaulicht das Schaltbild der verwendeten Messtechnik. Durch einen kurz hinter der Elektrode angebrachten Vorverstärker wurden mögliche Signalverluste eingehender Aktionspotentiale klein gehalten. Nach 10000-facher Amplifikation der Potentiale durch einen Differentialverstärker (DAM80-E, WPI, New-Haven, USA), wurden sie zu einem regelbaren Verstärker weitergeleitet, über den die Feinregulierung der Amplitudengröße vorgenommen wurde. Eingebaute Hoch- und Tiefpassfilter grenzten die für die Ableitung der Aktionspotentiale hauptsächlich Frequenzen von 0,3 bis 3 kHz ein. Um die eingehenden elektrischen Signale auf ihre Größe hin zu ermitteln und möglichst auf ein Neuron zu beschränken, wurde zusätzlich ein Fensterdiskriminator benutzt.

Die Signale wurden wie folgt abgebildet und aufgezeichnet:

- Die abgeleiteten und verstärkten Rohsignale wurden über einen an den Messstand angeschlossenen PC erfasst und mittels des Software-Programmes Spike-Spider (Forster und Handwerker, 1990) ausgewertet. Hierfür wurden die Aktionspotentiale jeweils in einem 15-sekündigen Zeitintervall gezählt und nach Form und Größe zusammengestellt.
- Über einen zweiten Computer (M24, Olivetti, Navara, Italien) erfolgte zur Sicherheit die Erstellung einer zweiten Kopie mittels des Programms M-Rate. Hier wurden die

verstärkten und gefilterten Signale über ein Interface in den PC eingespeist und in Form von Peristimulus-Zeit-Histogrammen gespeichert.

- Die visuelle Darstellung erfolgte über ein digitales (Classic 6000, Gould, Eastlake, USA) sowie ein analoges Oszilloskop (HM305-2, Hameg Instruments, Frankfurt). Das digitale Oszilloskop diente dabei zur Kontrolle der späteren Auswertung, indem die an ihm eingehenden gefilterten und gefensterten Spikes abgelesen und protokolliert wurden und somit mit der Anzahl der ausgewerteten Aktionspotentiale verglichen werden konnten. Das analoge Oszilloskop stellte die Aktionspotentiale sichtbar dar.
- Über einen Lautsprecher konnten die Aktionspotentiale anhand ihrer akustischen Signalform identifiziert und kontrolliert werden.

Der gesamte Ableitungsaufbau war mit einer schwebenden Erde (nicht dargestellt) getrennt geerdet, um mögliche Erdschleifen zu verhindern. Außerdem diente eine zwischen Thoraxwand und Haut eingestochene Silber- Silberchloridelektrode (WPI) als indifferente Elektrode zwischen Versuchstier und Ableittechnik.

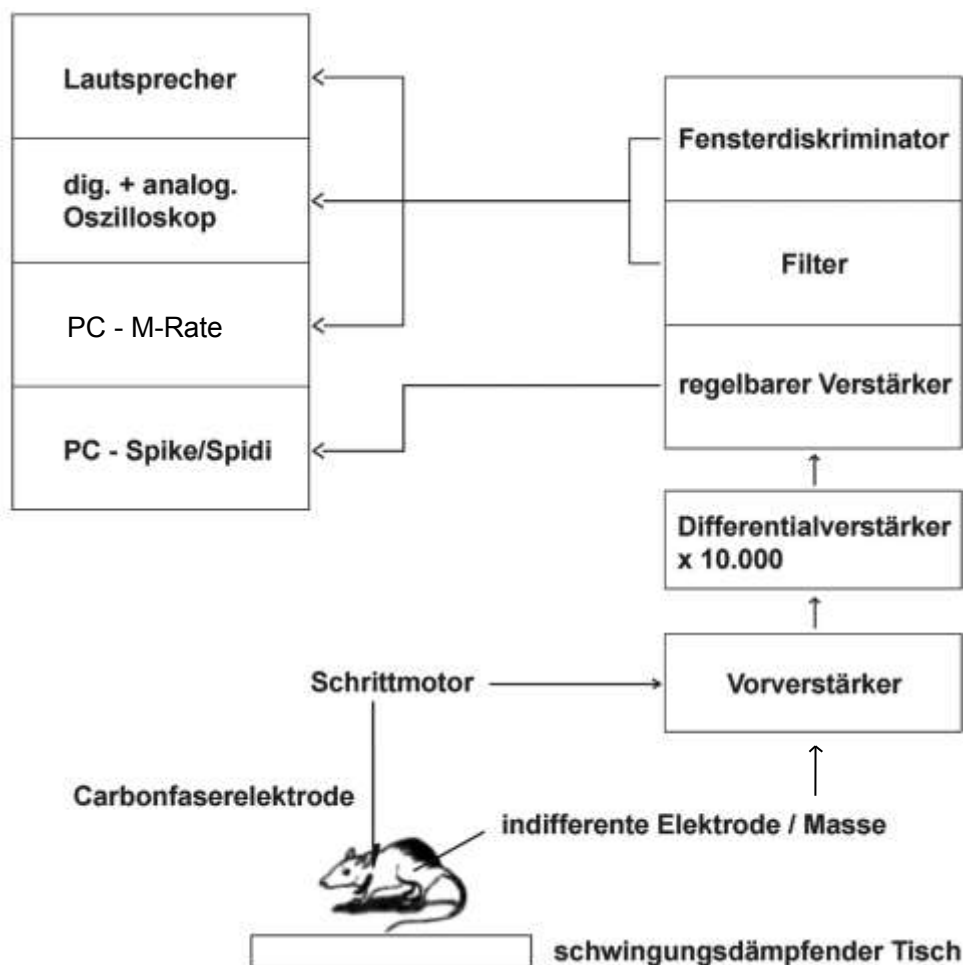


Abbildung 3: Schaltbild des Meßstandes

### 4.5.2 Standardisierung der Reizapplikation

Um eine standardisierte Reizapplikation innerhalb eines und für jedes weitere Experiment garantieren zu können, wurde von folgenden Instrumenten Gebrauch gemacht. Für die Reizung des Kniegelenkes in der mediolateralen Achse wurde ein justierbares Gerät in Form eines Stempels (Correx; Haag-Streit, Bern, Schweiz) neben dem linken Knie am Versuchsrahmen angebracht. Damit wurde gleich bleibend mit  $1,9 \text{ N}/40\text{mm}^2$  für den nicht schmerzhaften Reiz und mit  $7,8 \text{ N}/40\text{mm}^2$  für den schmerzhaften Reiz seitlich auf das in einer Haltevorrichtung in einem Flexionswinkel von ungefähr  $90\text{-}110^\circ$  fixierte Kniegelenk gepresst. Zur Reizung an Sprunggelenk und Pfote kamen zwei modifizierte Krokodilklemmen mit abgefeilten Zähnen und eingewickelten Backen zum Einsatz. Dabei wurde mit  $1,1 \text{ N}/20\text{mm}^2$  für den nicht schmerzhaften Reiz und mit  $5,8 \text{ N}/20\text{mm}^2$  für den schmerzhaften Reiz am mediolateralem Sprunggelenk sowie an der dorsoventralen Pfote stimuliert.

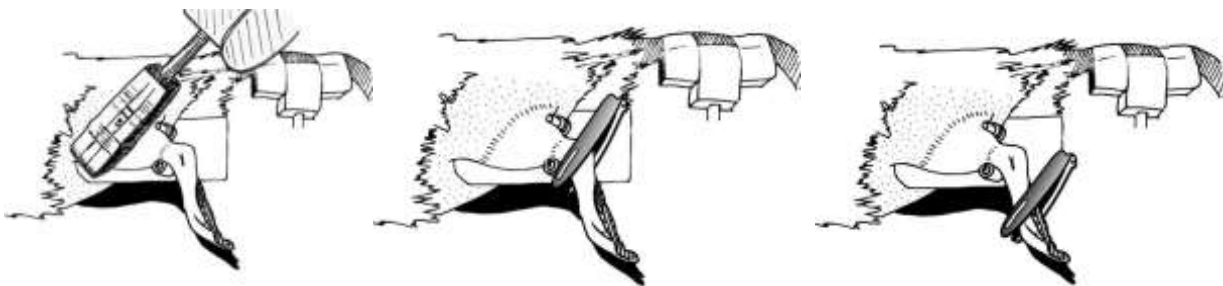


Abbildung 4: Darstellung der standardisierten Reizapplikation an Kniegelenk (Stempel), Sprunggelenk (Krokodilklemme) und Pfote (Krokodilklemme).

## 4.6 Versuchsablauf

### 4.6.1 Aufsuchen und Charakterisierung von Neuronen

Wie beschrieben, wurden unter manuellem, mediolateralem Druck auf das Kniegelenk und gleichzeitiger Bewegung der Elektrode Hinterhornneurone mit Eingang aus dem ipsilateralem, entzündeten Kniegelenk in Höhe der Segmente  $L_1$ - $L_4$  aufgesucht. Anhand der Form und der Größe des Aktionspotentials konnten die Neurone identifiziert werden. Wurde nun ein Neuron mit gleich bleibender Aktionspotentialgröße und -form am Oszilloskop identifiziert, so wurde es auf Folgendes untersucht:

- Verhalten auf nicht noxische und noxische Reize
- Größe des rezeptiven Feldes (Ausdehnung auf Sprunggelenk und Pfote)
- Verhalten auf Berührung und Kneifen der Haut
- Verhalten auf Bewegung des Kniegelenkes

- Allgemeine Entladungsfrequenz während eines definierten Zeitraumes
- Stabilität des Aktionspotentials bei Reizung
- Vorhandensein von Spontanaktivität
- Eingang anderer Neurone in die Registrierung

Reagierte ein Neuron auf nicht noxische und noxische Reize, so teilte man es in die Gruppe der WDR-Neurone ein. Antwortete es hingegen nur auf noxische Reize, so hatte man ein nozizeptiv spezifisches bzw. so genanntes HT-Neuron erfasst. Zur weiteren Charakterisierung des rezeptiven Feldes, wurden die tiefen Gewebsschichten (Muskeln, Bänder, Sehnen) ober- und unterhalb des Kniegelenkes sowie das Sprunggelenk und die Pfote mechanisch stimuliert und die Ergebnisse protokolliert. Neurone, die auf Berühren und Kneifen der Haut im Bereich des Kniegelenkes oder übermäßig auf Bewegung des Kniegelenkes durch Aktivierung der Propriozeptoren reagierten, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Um die Eignung des Neurons zur Ableitung über einen längeren Zeitraum abzuschätzen, wurden die Entladungsfrequenz und die Stabilität des Aktionspotentials begutachtet. Dabei sollte die Entladungsfrequenz mindestens 300 Spikes pro 15 Sekunden standardisierter Reizapplikation betragen. Das Aktionspotential sollte möglichst gleich bleibend in Form und Größe und in etwa drei Mal so groß wie die Hintergrundaktivität sein. War dies im Verlauf des Experimentes der Fall, so konnte man davon ausgehen, dass das gleiche Neuron abgeleitet wurde. Wies eine Nervenzelle Spontanaktivität auf, so wurde diese protokolliert und auf Veränderungen hin beobachtet. Wenn in die Registrierung eine zweite Nervenzellen mit einlief, so wurde dies ebenfalls notiert, um in der späteren Auswertung mögliche Fehlerquellen berücksichtigen zu können.

#### **4.6.2 Versuchsprotokolle**

Unsere Absicht war es, das Antwortverhalten einzelner Hinterhornneurone auf Stimulation des akut und chronisch entzündeten Kniegelenkes sowie des normalen Sprunggelenkes und Pfote unter spinaler Applikation der verschiedenen EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten, unter der Applikation des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 und -Antagonisten ONO-AE3-240 sowie unter Indomethacin, Diclofenac und dem selektiven COX-2 Hemmer NS-398 zu untersuchen.

War eine stabile Nervenzelle mit den gewünschten Voraussetzungen aufgefunden, wurde zunächst ungefähr 10 min zur Erholung der Zelle pausiert. Um die Grundaktivität der Zelle zu bestimmen, applizierten wir auf das Rückenmark Tyrodelösung oder das Lösungsmittel der zu untersuchenden Substanz und leiteten die Zelle so lange ab, bis die Antworten stabil waren.



Die letzten 30 min wurden als Baseline gekennzeichnet. Nach dem Auswaschen des Lösungsmittels, wurden ca. 30-50  $\mu\text{l}$  der Testsubstanz in den Pool pipettiert. Alle 5 Minuten wurde ein schmerzhafter und nicht schmerzhafter Stimulus an Knie-, Sprunggelenk und Pfote gesetzt. Ein einzelner Stimulus dauerte 15 Sekunden, dem jeweils eine 15-sekündige Pause folgte. Nach der letzten Reizung an der Pfote wurde für 2 Minuten pausiert bis ein neuer Testblock begann. Abhängig vom Versuchsprotokoll wurde nach Etablierung der Baseline eine Reizserie von 10 Testblöcken mit einer Testsubstanz durchgeführt. Danach wurde entweder eine höhere Dosis der getesteten Substanz auf das Rückenmark aufgebracht, oder diese, nach vorheriger Reinigung des Rückenmarkspools, gegen eine andere ausgetauscht. Die detaillierten Testprotokolle sind in den Tabellen 3, 4 und 5 beschrieben.

Im Einzelnen wurde folgenden Fragen nachgegangen:

- Welchen Einfluss auf die spinale Schmerzverarbeitung haben EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten am Tag 3 und 21 nach Entzündungsinduktion?

Tabelle 3: Testprotokolle der verschiedenen Prostaglandinrezeptoragonisten und des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240.

3d	Baseline	EP <sub>3</sub> -Antagon.	EP <sub>2</sub>	EP <sub>4</sub>	EP <sub>1</sub>	n = 3
21d	Baseline	EP <sub>2</sub>	EP <sub>4</sub>	EP <sub>1</sub>		n = 5
	0	30	80	130	180	230 min

- Inwiefern ändert sich das Antwortverhalten eines Rückenmarksneurones auf einen in ansteigender Dosierung spinal applizierten EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten (ONO-AE-248) zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Entzündung? Lässt sich für den EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ebenso eine hemmende Wirkung auf die nozizeptive Signalverarbeitung am Tag 3 und 21 nach Arthritisinduktion feststellen wie bei einer akuten Entzündung? Welchen Einfluss hat der EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist (ONO-AE3-240) auf das Antwortverhalten am Tag 3 nach Arthritisinduktion?

Tabelle 4: Testprotokolle des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 und des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240.

3d	Baseline	1 ng/ $\mu\text{l}$	10 ng/ $\mu\text{l}$	100 ng/ $\mu\text{l}$	ONO-AE-248	n = 6
21d	Baseline	1 ng/ $\mu\text{l}$	10 ng/ $\mu\text{l}$	100 ng/ $\mu\text{l}$	ONO-AE-248	n = 6
3d	Baseline	1 ng/ $\mu\text{l}$	10 ng/ $\mu\text{l}$	100 ng/ $\mu\text{l}$	ONO-AE3-240	n = 2
	0	30	80	130	180	min

- Wie beeinflussen spinal applizierte unselektive (Indomethacin und Diclofenac) und selektive COX-2 Inhibitoren (NS-398) das Antwortverhalten von Rückenmarksneuronen unter akuten (Tag 1 und 3) und chronischen (Tag 21) Entzündungsbedingungen?

**Tabelle 5:** Testprotokolle der unselektiven COX-Hemmer Diclofenac und Indomethacin und des selektiven COX-Hemmer NS-398.

1d	Baseline	Diclofenac	Diclofenac	NS-398		n = 1	
1d	Baseline	Diclofenac	NS-398			n = 1	
3d	Baseline	Diclofenac	Diclofenac	NS-398		n = 3	
3d	Baseline	Indomethacin	Indomethacin	NS-398		n = 1	
3d	Baseline	Indomethacin	NS-398	Methanandamid		n = 3	
21	Baseline	Diclofenac	Diclofenac	NS-398		n = 6	
<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> <span>0</span> <span>30</span> <span>80</span> <span>130</span> <span>180</span> <span>min</span> </div>							

#### 4.7 Auswertung und Statistik

Während des Experimentes wurden die Daten offline mit Hilfe des Software-Programms Spike-Spidi (Forster und Handwerker, 1990) aufgezeichnet und nachfolgend mit der gleichen Software bearbeitet und ausgewertet. Hierfür wurden die Aktionspotentiale in einem 15-sekündigem Zeitintervall ausgezählt und solche, die sich stark in Form und Größe zum abgeleiteten Neuron unterschieden, von der Auswertung ausgenommen. Anschließend konnten mit den ausgewerteten Daten und dem Software-Programm Origin entsprechende Grafiken erstellt werden. Zur statistischen Datenanalyse wurden die Werte 30 min vor Substanzapplikation (Baseline) gemittelt (Mittelwert  $\pm$  SEM). Nach Substanzapplikation wurde ebenso der Mittelwert von den Antworten jedes Stimulus innerhalb einer halben Stunde gebildet und die Antworten der Baseline subtrahiert. Zum Vergleich der Werte der Baseline und der Werte der getesteten Substanz wurde der Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben herangezogen, wobei Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen wurde.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung spinaler Neurone

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 42 Tiere getestet, von denen 37 in die Auswertung eingingen. Fünf Tiere lieferten aus unterschiedlichen Gründen keine Ergebnisse. Generell wurde jeweils an einem Tier nur ein Neuron abgeleitet und ein Versuchsprotokoll erstellt, niemals erfolgte die Durchführung von zwei Testprotokollen.

Verloren wir ein Neuron während der Erstellung der Baseline, d.h. unter Applikation des Substanzlösungsmittels, so wurde ein neues aufgesucht und das Testprotokoll begann von vorn. Lediglich bei einem Versuch verloren wir die Zelle vor dem geplanten Ende, konnten die Werte jedoch mit in die Auswertung einbeziehen, da ausreichend Testblöcke durchgeführt wurden.

Als Ausschlusskriterien zur Ableitung eines Neurons galten:

- Starker Eingang kutaner und propriozeptiver Signale aus dem Bereich des Kniegelenkes
- Ungenügende Anzahl von Entladungen ( $<300$  spikes) während eines definierten Reizintervalls (15 sec)
- Stark wechselnde Form und Größe des Aktionspotentials
- Kontamination der Ableitung durch ein weiteres Neuron

#### 5.1.1 Klassifikation und Lokalisation der Neurone

Wie bereits erwähnt, lassen sich Rückenmarksneurone bezüglich ihrer mechanischen Aktivierungsschwelle und ihres Antwortverhaltens auf noxische und innoxische Reizung in WDR-Neurone und in HT-Neurone einteilen (Schaible & Grubb 1993). Bei gesamt 42 ausgewerteten Experimenten konnte die Mehrzahl als WDR-Neurone (37) identifiziert werden, 5 wurden als HT-Neurone klassifiziert, insgesamt zeigten 17 Neurone Spontanaktivität.

Sämtliche Nervenzellen befanden sich im Bereich  $L_1$ - $L_4$  des Lumbalmarks, das grundsätzlich afferenten Eingang aus der unteren Extremität erhält. Die erfassten Neurone lagen im Durchschnitt im tiefen Hinterhorn in einer Tiefe von  $950 \pm 191 \mu\text{m}$  (620-1248  $\mu\text{m}$ ). Bezüglich der Tiefenlokalisierung zeigte sich kein Unterschied zwischen WDR und HT-Neuronen.

### 5.1.2 Rezeptive Felder

Das rezeptive Feld beschreibt einen peripheren Bereich, der, wenn er stimuliert wird, ein Aktionspotential im dazugehörigen Rückenmarksneuron generiert (Schaible 1998). Häufig zeigen die Neurone dabei konvergenten Einstrom aus Kniegelenk, angrenzenden tiefen Gewebsstrukturen ober- und unterhalb des Gelenkes sowie Muskeln und Haut (Schaible et al. 1987). Wie bereits dargestellt, wurde die Ausbreitung des rezeptiven Feldes der abgeleiteten Neurone durch manuellen Druck auf das Kniegelenk, auf angrenzendes Gewebe des Ober- und Unterschenkels sowie auf Sprunggelenk und Pfote bestimmt. Außerdem wurde durch Bestreichen und Kneifen der Haut sowie Bewegung des Beines innerhalb der normalen Freiheitsgrade der mögliche Einstrom kutaner sowie propriozeptiver Afferenzen zum Neuron geprüft.

Sämtliche Neuronen reagierten auf mechanische Kompression des Kniegelenkes sowie teilweise auf die Reizung von Sprunggelenk und Pfote. Ein Großteil der Nervenzellen war dabei zusätzlich durch die mechanische Kompression angrenzenden Muskelgewebes stimulierbar. Das rezeptive Feld umfasste somit v.a. Gelenke, Muskeln und Ligamente. Eine geringe Anzahl der Neurone wurde zusätzlich durch Bestreichen und Kneifen der Haut sowie Bewegung des Beines innerhalb der natürlichen Freiheitsgrade aktiviert. Neurone, die jedoch übermäßig auf Hautreize reagierten oder über ein kutanes rezeptives Feld im Bereich des Kniegelenkes verfügten, wurden von vornherein von der Ableitung ausgeschlossen.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Art der abgeleiteten Neurone sowie deren rezeptive Felder und Afferenzen wieder. Von den insgesamt 42 Neuronen waren 37 WDR-Neurone und 5 HT-Neurone, wobei alle 42 Neurone Afferenz aus dem Kniegelenk hatten und zum Teil ihr rezeptives Feld auf Sprunggelenk und Pfote ausdehnten. Zudem konnten 34 der WDR-Neurone über Kompression von angrenzendem Muskelgewebe aktiviert werden. Die wenigsten Neurone wurden via Haut- (9) und Bewegungsrezeptoren (2) aktiviert, wobei sich die kutanen Afferenzen nicht über dem Kniegelenk befanden. 17 der abgeleiteten Neurone zeigten Spontanaktivität, welche jedoch keine Berücksichtigung in der Tabelle fand.

Eine Einteilung der Neurone bezüglich Entzündungsstadium, Neuronentiefe und Art ist in Tabelle 7 aufgelistet. Bezüglich der Tiefenlokalisation ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede innerhalb der verschiedenen Entzündungsstadien. Im Mittel befanden sich die abgeleiteten Neurone in einer Tiefe von  $950 \pm 191 \mu\text{m}$  und waren somit hauptsächlich im tiefen Hinterhorn lokalisiert. Am Tag 1 nach Arthritisinduktion wurden jeweils nur WDR-Neurone identifiziert. Am Tag 3 und 21 waren es sowohl WDR- als auch HT-Neurone.

**Tabelle 6:** Rezeptive Felder der abgeleiteten Neurone. Einteilung nach Art (WDR oder HT), Ursprung der eingehenden Afferenzen aus Haut-, Muskel (M)- oder Bewegungsrezeptoren (B) und Ausbreitung des rezeptiven Feldes auf Kniegelenk (KG), Sprunggelenk (SG) und Pfote (P). n gibt die Gesamtzahl an.

Typ	n	Haut	M	B	KG	SG	P
<b>WDR</b>	37	9	34	2	37	34	19
<b>HT</b>	5	0	4	0	5	5	1
<b>n</b>	42	9	38	2	42	39	20

**Tabelle 7:** Einteilung der Neurone bezüglich Entzündungsstadium, Neuronentiefe und Art.

Tag d. AIA	1	3	21	gesamt
<b>Tiefe in <math>\mu\text{m}</math></b>	963,67 $\pm$ 228,92	938,79 $\pm$ 163,38	948,10 $\pm$ 180,95	950,19 $\pm$ 191,1
<b>WDR</b>	3	16	18	37
<b>HT</b>	0	3	2	5
<b>n</b>	3	19	20	42

## 5.2 Bewertung der Arthritis anhand Gelenkumfang und Histologie

Hinsichtlich der Gelenkschwellung ließen sich sowohl visuell als auch in den gemessenen Gelenksumfängen Unterschiede feststellen. In der initial akuten Phase der Entzündung war das Kniegelenk im Vergleich zum normalen Knie stark geschwollen. Diese Gelenkschwellung war 3 Tage nach Induktion der Entzündung persistierend, zeigte jedoch in der chronischen Phase kaum noch einen Unterschied zum gesunden Kniegelenk. Tabelle 8 gibt einen Überblick zu den gemessenen Umfängen der Kniegelenke 1, 3, und 21 Tage nach Induktion der Arthritis wieder. Daraus geht hervor, dass die Umfangsdifferenzen zwischen dem rechten und dem linken Kniegelenk mit  $0,63 \pm 0,11$  cm am Tag 1 und  $0,99 \pm 0,07$  cm am Tag 3 im Vergleich zum Tag 21 mit einer Differenz von  $0,09 \pm 0,02$  cm am größten sind und dass am Tag 3 nach Arthritisinduktion die Kniegelenksschwellung am deutlichsten ausgebildet war.

Die stärker ausgebildete Entzündung an jenen Tagen spiegelte sich auch im Verhalten der Tiere wieder. Da wir sie nicht systematisch bezüglich Verhaltensänderungen untersuchten, lässt sich hier auch keine verallgemeinernde Beurteilung ableiten. Für den kurzen Zeitrahmen unserer Beobachtung der Tiere war jedoch auffällig, dass die Tiere mit einer akuten Entzündung (Tag 1 und 3) ein deutlich ausgeprägteres schmerzvermeidendes Verhalten präsentierten, indem sie das betroffene Bein weniger belasteten, es hinterher zogen und zudem stärker hinkten, als Tiere mit einer seit 21 Tagen bestehenden Kniegelenksentzündung. Diese zeigten kaum Hinken, Hinterherziehen beziehungsweise Nichtbelasten des Beines.

Außerdem reagierten die Tiere mit akuter Entzündung auf manuellen Druck auf das entzündete Knie ausgesprochen empfindlich und deutlich aggressiver als jene mit einer chronischen Entzündung.

Tabelle 8: Vergleich Kniegelenksumfänge. Auflistung der gemittelten Werte und deren Differenzen in cm im Seitenvergleich am Tag 1, 3 und 21 nach Arthritisinduktion. Im linken Knie wurde die AIA induziert, das rechte Knie war unbeeinträchtigt.

U in cm, Tag 1, n=3		U in cm, Tag 3, n=19		U in cm (Tag 21), n=20	
links	rechts	links	rechts	links	rechts
6,13±0,06	5,5±0,17	6,81±0,5	5,82±0,43	5,91±0,49	5,82±0,47
$\Delta$ : 0,63±0,11		$\Delta$ : 0,99±0,07		$\Delta$ : 0,09±0,02	

Von insgesamt 3 Tieren wurden histologische Präparate angefertigt, um die feingeweblichen Gelenksveränderungen stichprobenartig beurteilen zu können. Abbildung 5 zeigt das einer akuten Entzündung. in Abbildung 6 sind die Veränderungen eines chronisch entzündeten Kniegelenkes ersichtlich, welches unserem Tierpool entstammt. Bei der akuten Entzündung ist ein granulozytäres Infiltrat in der Synovia und im Gelenkspalt sowie vereinzelte Chondrozytennekrosen sichtbar. Bei der chronischen Entzündung hingegen lassen sich vermehrt mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen erkennen. Die Synovia erscheint verdickt (Pannusbildung) und fibrosiert.

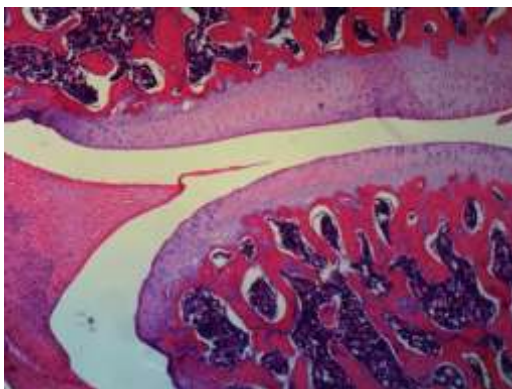


Abbildung 5: akut entzündetes Gelenk

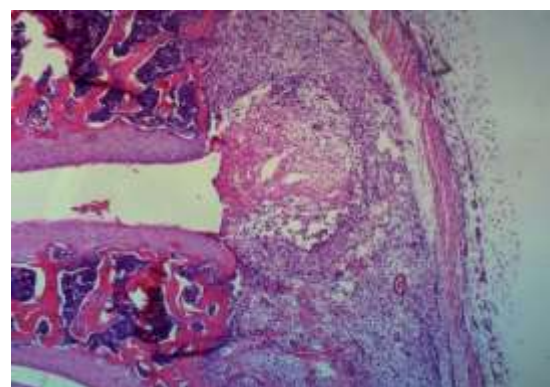


Abbildung 6: chronisch entzündetes Gelenk

### **5.3 Einfluss der EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen im Verlauf einer Arthritis**

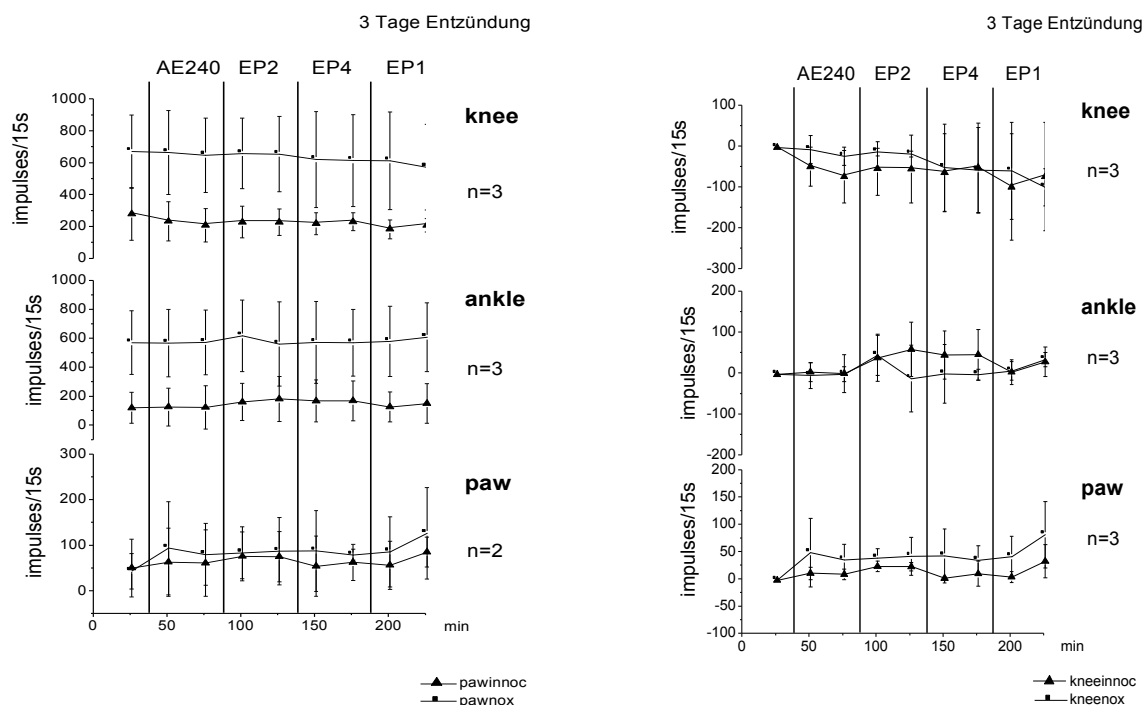
Versuche der Arbeitsgruppe Bär et al. haben gezeigt, dass unter normalen Bedingungen sowohl EP<sub>1</sub>- als auch EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten in der Lage sind, einen Zustand der spinalen Hyperexzitabilität zu induzieren, wie er durch topisch appliziertes PGE<sub>2</sub> hervorgerufen wird (Bär et al. 2004). Weitere Experimente verdeutlichten allerdings auch, dass es, während einer akuten Entzündung (7-11 h nach K/C-Injektion ins Kniegelenk), nur dem EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten vorbehalten war, zu einer signifikanten Steigerung der neuronalen Entladung auf mechanische Kompression zu führen, während die EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten diesbezüglich wirkungslos blieben (Bär et al. 2004). Diese Resultate weisen auf eine Änderung der Rezeptoraktivierung bzw. -sensibilität in Abhängigkeit vom Entzündungsstadium (entzündet vs. nicht entzündet) des Tieres hin. Folglich interessierte es uns, ob eine ähnliche Dynamik im Wirkungsprofil der unterschiedlichen EP-Rezeptor-Agonisten während verschiedener Entzündungsphasen eine Rolle spielt. Da bereits ausreichend Experimente zum Zeitpunkt einer akuten Arthritis von der Arbeitsgruppe Bär et al. bestanden, beschränkten wir uns auf die Untersuchung der Substanzen zum Zeitpunkt einer fortgeschrittenen akuten (3d) und chronischen (21d) AI-Arthritis.

#### **5.3.1 Effekt der EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion**

Bei insgesamt 3 Tieren wurde die Auswirkung der spinalen Applikation des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240 und der verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion untersucht. Nach Etablierung der Baseline mit dem Substanzlösungsmittel wurde zunächst für 10 Reizserien der Effekt des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten in einer Konzentration von 100 ng/μl getestet, anschließend wurden, nach jeweils mehrmaligem Waschen, der EP<sub>2</sub>-, EP<sub>4</sub>- und EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist in einer Konzentration von je 100 ng/μl auf das freigelegte Rückenmark aufpipettiert und ebenfalls für je 10 Testblöcke der Prüfung unterzogen.

Der Effekt des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240 wird in Abschnitt 5.5 abgehandelt, sodass hier nicht weiter darauf eingegangen wird. Zusammenfassend ließ sich für ihn keine eindeutige Wirkung auf die Entladungsrate der abgeleiteten Neurone nachweisen. Für die getesteten EP-Rezeptor-Agonisten ergaben sich unterschiedliche Werte. Aufgrund der zu geringen Fallzahl kann jedoch keine Aussage über statistische Signifikanz getroffen werden, weshalb die Beschreibung der Ergebnisse deskriptiv erfolgt. Abbildung 7 und Tabelle 9 geben

die Ergebnisse in graphischer und tabellarischer Form wieder. Hier lässt sich erkennen, dass es unter noxischer und innoxischer Stimulation am entzündeten Kniegelenk unter allen getesteten EP-Rezeptor-Agonisten zu einem tendenziellen Abfall der Entladungen kam. Betrug die Baselineaktivität am Kniegelenk  $288 \pm 165$  für innoxische und  $678 \pm 230$  Impulse/15 sec für noxische Stimulation konnte unter dem EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten eine Reduktion um  $52 \pm 74$  (innoxisch) und  $14 \pm 1$  (noxisch) Impulsen/15 sec beobachtet werden. Analog verhielt es sich bei den EP<sub>4</sub>- und EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten, bei denen ein Abfall um  $56 \pm 102$  und  $52 \pm 65$  (EP<sub>4</sub>) bzw. um  $84 \pm 114$  und  $77 \pm 56$  (EP<sub>1</sub>) auf innoxische und noxische Reizung des Knies zu verzeichnen war. Demgegenüber zeigte sich ein anderes Antwortverhalten bei der Stimulation des nicht entzündeten Sprunggelenkes und der Pfote. Hierbei kam es durchgängig zu einer tendenziellen Steigerung der Antworten. Während die Grundaktivität unter Vehikelzusatz  $129 \pm 108$  für innoxische und  $579 \pm 220$  Impulse/15 sec für noxische Stimulation betrug, war eine durchweg gesteigerte Impulsrate/15sec Reizapplikation von  $51 \pm 34$  bzw.  $19 \pm 46$  für den EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten Butaprost,  $48 \pm 33$  bzw.  $1 \pm 36$  für den EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten und von  $18 \pm 12$  bzw.  $23 \pm 20$  für den EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten ersichtlich. Für die nicht noxische und noxische Pfotenstimulation lies sich ebenso eine Steigerung der Antworten gegenüber der Grundaktivität unter allen EP-Rezeptor-Agonisten feststellen, wobei hier nur 2 Neurone in die Auswertung eingingen.



**Abbildung 7:** Einfluss von ONO-AE3-240 (AE-240) und der verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten (EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub>, EP<sub>1</sub>) am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Die Substanzen wurden zu jeweils 10 Testblöcken



getestet. Jeder Punkt entspricht dabei den gemittelten Antworten  $\pm$  SEM aus je 5 Reizblöcken auf innoxische ( $\blacktriangle$ , innox) und noxische ( $\blacksquare$ , nox) Stimulation von Kniegelenk (knee), Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw). Für die Baselineaktivität unter dem Vehikelzusatz wurden 6 Reizblöcke gemittelt. In der rechten Grafik wurden die gemittelten Werte als Differenz zur Baselinegrundaktivität angegeben.

**Tabelle 9:** Antwortverhalten spinaler Neurone unter den verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SDM von 3 Neuronen unter innoxischer (innox) und noxischer (nox) Stimulation an Knie (KG)-, Sprunggelenk (SG) und Pfote (P) in Impulsen/15sec Reizapplikation aus je 6 Reizblöcken für das Vehikel und je 10 für die EP<sub>2</sub>-, EP<sub>4</sub>- und EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten. Die Werte für den EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten wurden zur Vereinfachung herausgenommen.

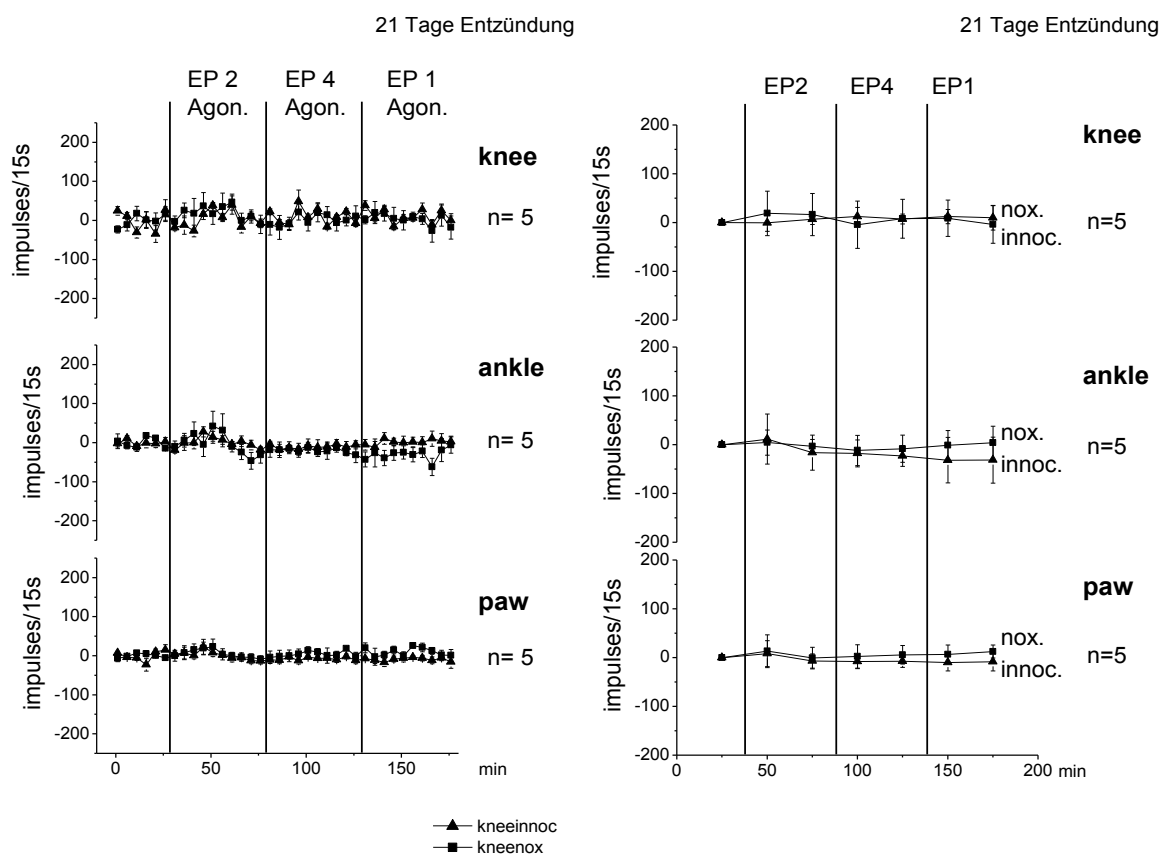
Stimulus		Vehikel	EP <sub>2</sub>	EP <sub>4</sub>	EP <sub>1</sub>
Impulse/15 sec	<b>KG</b> innox	288 $\pm$ 165	236 $\pm$ 91	232 $\pm$ 63	204 $\pm$ 51
	nox	678 $\pm$ 230	664 $\pm$ 229	626 $\pm$ 295	601 $\pm$ 286
	<b>SG</b> innox	129 $\pm$ 108	180 $\pm$ 142	177 $\pm$ 141	147 $\pm$ 120
	nox	579 $\pm$ 220	598 $\pm$ 266	580 $\pm$ 256	602 $\pm$ 240
	<b>P</b> innox	53 $\pm$ 63	78 $\pm$ 54	61 $\pm$ 53	73 $\pm$ 43
	nox	46 $\pm$ 39	88 $\pm$ 65	86 $\pm$ 50	109 $\pm$ 89

### 5.3.2 Effekt der EP<sub>1</sub>- EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Agonisten am Tag 21 nach Arthritisinduktion

Zusätzlich wurde an 5 Versuchstieren untersucht, inwieweit die verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten unter chronischen Entzündungsbedingungen einen Einfluss auf die Entladungsrate der abgeleiteten Hinterhornneurone hatten. Nachdem die Grundaktivität mit dem Substanzlösungsmittel ermittelt wurde, wurden die Agonisten in einer Konzentration von je 100 ng/ $\mu$ l analog zum Testprotokoll vom Tag 3 nach Arthritisinduktion zu je 10 Reizblöcken nacheinander geprüft.

Abbildung 8 gibt das Testprotokoll graphisch wieder. Eine wesentliche Beeinflussung des Entladungsverhaltens ober- oder unterhalb der Baselineaktivität hinaus konnte zu diesem Zeitpunkt der Arthritis nicht festgestellt werden. Die Abweichungen von der Baselineaktivität auf innoxische und noxische Reizung aller drei Reizorte waren minimal und erreichten bei allen drei getesteten EP-Rezeptor-Agonisten keine Signifikanz ( $p > 0,05$  im Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben). So kam es unter dem EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten Butaprost im Mittel zu einer minimalen Steigerung der Aktivität um  $18 \pm 16$  Impulse/15sec auf schmerzhafte Kniestimulation, während der EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist die Entladungsrate um  $2 \pm 1$  und der

21 Tage Entzündung



**Abbildung 8:** Einfluss der verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 21 nach Arthritisinduktion. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von insgesamt 5 Neuronen in Impulsen/15 sec abzüglich der Baselinegrundaktivität auf nicht noxische ( $\blacktriangle$ , innox) und noxische ( $\blacksquare$ , nox) Reizung von Knie (knee)- und Sprunggelenk (ankle) sowie Pfote (paw). In der rechten Grafik erfolgte die vereinfachende Darstellung durch Mittelung der Werte aus je 5 Reizblöcken.

Tabelle 10: Antwortverhalten spinaler Neurone unter den verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 21 nach Arthritisinduktion. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SDM von insgesamt 5 Neuronen in Impulsen/15 sec für innoxische (innox) und noxische (nox) Stimulation an Knie (KG)-, Sprunggelenk

(SG) und Pfote (P). Für das Substanzlösungsmittel wurden 6 Reizblöcke gemittelt, für die EP-Rezeptor-Agonisten jeweils 10.

Stimulus		Vehikel	EP <sub>2</sub>	EP <sub>4</sub>	EP <sub>1</sub>
Impulse/15 sec	KG innox	269±157	272±159	279±159	280±160
	nox	648±267	666±283	650±266	651±244
	SG innox	100±79	101±79	90±58	102±72
	nox	342±145	340±148	322±132	310±123
	P innox	41±55	42±62	34±44	32±39
	nox	71±85	77±87	75±64	80±73

#### 5.4 Einfluss des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen im Verlauf einer Arthritis

In der Arbeit von Bär et al. wurde gezeigt, dass die spinale Applikation des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 zu einer Reduktion der Antworten bei bereits bestehender Hyperexzitabilität ca. 7-8 h nach Induktion einer akuten Arthritis mit K/C führt (Bär et al. 2004). Folglich interessierte uns die Frage, ob dieser Effekt ebenso unter fortgeschrittenen akuten sowie chronischen Entzündungsbedingungen nachweisbar war.

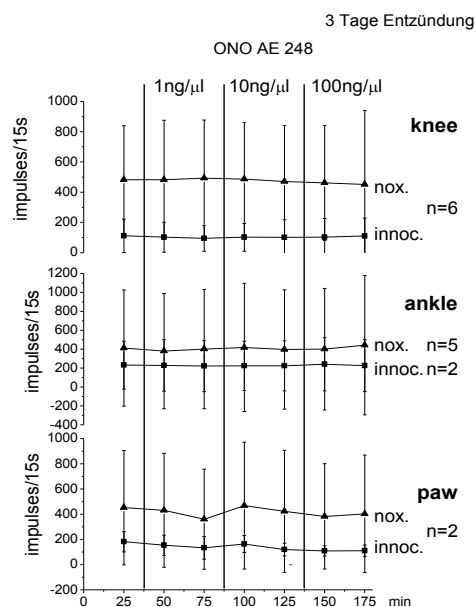
##### 5.4.1 Effekt von ONO-AE-248 am Tag 3 nach Arthritisinduktion

Nach Etablierung einer stabilen Baseline für 30 Minuten wurde ONO-AE-248 in steigender Konzentration zu je 10 Reizblöcken getestet. Tabelle 11 und Abbildung 9 verdeutlichen eindrucksvoll, dass die spinale Applikation des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten zum Zeitpunkt einer fortgeschrittenen akuten Entzündung in den 3 getesteten Dosierungen von 1, 10 und 100 ng/μl zu keiner signifikanten Beeinflussung der Entladungsrate über die gesamte Testdauer führte. Die Antworten der Hinterhornneurone ließen sich, sowohl bei nicht schmerzhafter als auch schmerzhafter mechanischer Kompression von Knie-, Sprunggelenk und Pfote, nicht unterhalb der Baselineaktivität, welche mit dem Vehikel Ethanol in Tyrodelösung erstellt wurde, absenken. Betrug die Grundaktivitäten unter der Vehikellösung  $112 \pm 111$  für innoxischen Druck und  $483 \pm 358$  Impulse/15 sec für noxischen Druck auf das Kniegelenk, erreichten weder die Werte für innoxische (Abfall um  $13 \pm 19$  für 1 ng/μl,  $10 \pm 7$  für 10 ng/μl und  $12 \pm 6$  Impulse/15 sec für 100 ng/μl) als auch noxische Reizung (Steigerung um  $5 \pm 30$  für 1 ng/μl sowie Abfall um  $3 \pm 14$  für 10 ng/μl und  $21 \pm 51$  Impulse/15 sec für 100 ng/μl) des entzündeten Kniegelenkes unter ONO-AE-248 eine statistisch gesicherte Signifikanz ( $p > 0,05$  im Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben). Selbiges lässt sich über die erreichten Werte für die Sprunggelenksreizung aussagen. Weder die Änderungen bei nicht schmerzhafter (Abfall

um  $3 \pm 96$  für  $1\text{ ng}/\mu\text{l}$  bzw.  $3 \pm 3$  für  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$  sowie eine Steigerung um  $1 \pm 14$  Impulse/15 sec für  $100\text{ ng}/\mu\text{l}$  noch schmerzhafter Reizung (Reduktion um  $22 \pm 6$  für  $1\text{ ng}/\mu\text{l}$ ,  $4 \pm 40$  für  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$  und  $16 \pm 32$  Impulse/15 sec für  $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ ) des Sprunggelenkes zeigten im Vergleich zur Grundaktivität eine bedeutsame Differenz.

**Tabelle 11:** Antwortverhalten spinaler Neurone unter ONO-AE-248 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SDM (in Impulsen/ 15 sec) aus 6 Neuronen auf nicht noxische (innox) und noxische (nox) Reizung an Knie (KG)- und Sprunggelenk (SG) unter Einwirkung des Substanzlösungsmittels (Vehikel) bzw. unter Einwirkung des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 aus je 10 Antworten in aufsteigender Konzentration von 1, 10 oder  $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ .

Tests substanz Stimulus	Vehikel (0-30')	ONO-AE-248		
		1 ng/ $\mu\text{l}$ (30-80')	10 ng/ $\mu\text{l}$ (80-130')	100 ng/ $\mu\text{l}$ (130-180')
<b>KG innox</b>	112 $\pm$ 111	99 $\pm$ 92	102 $\pm$ 104	100 $\pm$ 117
nox	483 $\pm$ 358	488 $\pm$ 388	480 $\pm$ 372	462 $\pm$ 409
<b>SG innox</b>	116 $\pm$ 204	113 $\pm$ 108	113 $\pm$ 207	117 $\pm$ 218
nox	413 $\pm$ 614	391 $\pm$ 620	409 $\pm$ 654	397 $\pm$ 646



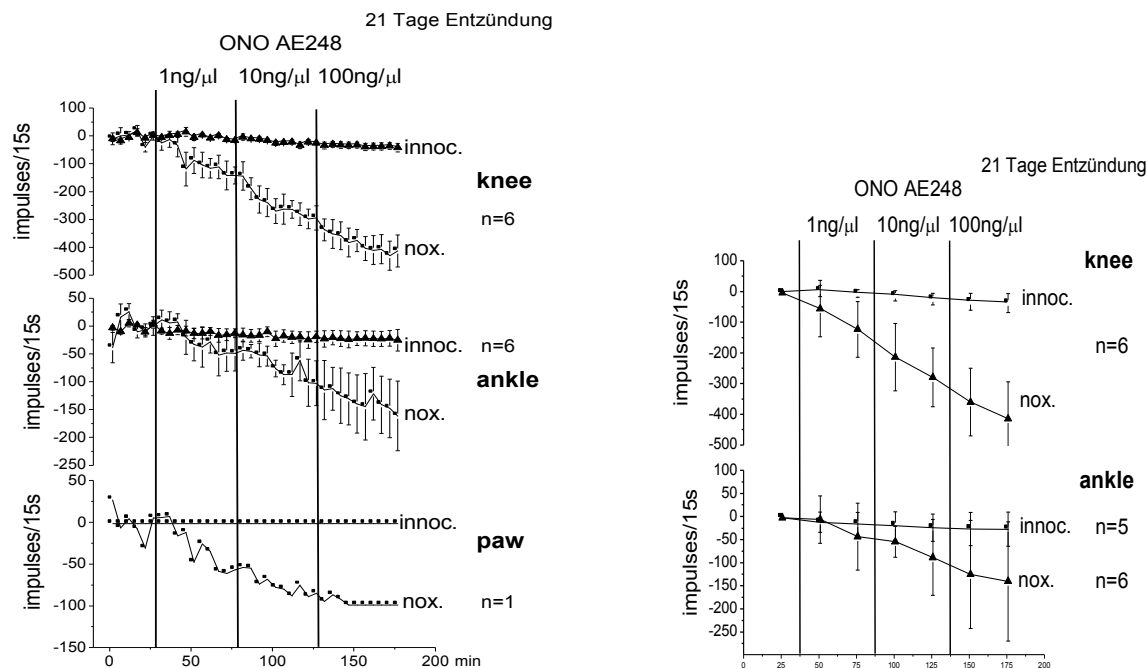
**Abbildung 9:** Einfluss von ONO-AE-248 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Nach Etablierung der Baseline mit dem Vehikel (Tyrodelösung) für 30 min wurde an insgesamt 6 Tieren ONO-AE-248 in aufsteigender Konzentration zu je 10 Reizblöcken getestet. Die Punkte entsprechen dabei den gemittelten Antworten  $\pm$  SEM von je 5 Reizblöcken auf nicht noxische ( $\blacksquare$ , innox) und noxische ( $\blacktriangle$ ,

nox) Reizung von Kniegelenk (knee), Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw). Für die Baselineaktivität wurden die Werte aus 6 Reizblöcken gemittelt.

#### **5.4.2 Effekt von ONO-AE-248 am Tag 21 nach Arthritisinduktion**

Den Ergebnissen am Tag 3 nach Entzündungsinduktion stehen die unter chronischen Entzündungsbedingungen gegenüber. Wir verwendeten das gleiche Testprotokoll und testeten, nach Etablierung einer stabilen Baseline unter Vehikelzusatz, den EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten in aufsteigender Dosierung von 1, 10 und 100 ng/μl zu je 10 Testblöcken.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen am Tag 3, kam es hier zu einer deutlichen Reduktion der Antworten an allen drei Reizorten auf sowohl innoxische als auch noxische Reizung, ohne dass eine Terminierung der Substanzwirkung in dem von uns beobachteten Zeitraum ersichtlich wurde. Bereits innerhalb der ersten fünf Reizblöcke konnte eine tendenzielle Reduktion festgestellt werden, wobei bei der innoxischen und noxischen Kompression des Knie- sowie des Sprunggelenks Signifikanz erreicht wurde. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei der schmerzhaften Kniegelenksreizung. Hier wurde schon in der zweiten Testhälfte der niedrigsten Konzentration von 1 ng/μl, d.h. ab dem 5 Reizblock, eine signifikante Absenkung der Reizantworten erreicht ( $p < 0,05$  im Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben). Im Mittel bedeutete dies, dass die Antworten zu diesem Zeitpunkt eine Absenkung von  $52 \pm 22$  Impulsen/15 sec gegenüber der Baselineaktivität zur Folge hatten, um dann im weiteren Verlauf um  $411 \pm 60$  Impulsen/15 sec während der letzten 5 Reizblöcke unter der Höchstdosierung von 100 ng/μl zu fallen. Betrug die Grundaktivität während der noxischen Kompression des Sprunggelenkes  $262 \pm 248$  Impulse/15sec, so waren es im Mittel während der letzten 5 Blöcke unter 100 ng/μl  $125 \pm 143$ , was einer Reduktion um  $137 \pm 105$  Impulsen/15 sec entspricht. Auch wenn es auf den ersten Blick nicht der Fall zu sein scheint, so wurde ebenso für die nicht schmerzhaft Reizung von Knie und Sprunggelenk Signifikanz erreicht. Wurden unter Vehikelzusatz am Knie zunächst  $46 \pm 41$  Impulse/15 sec im Mittel gezählt, so waren es am Ende  $12 \pm 13$  Impulse/15 sec unter der Höchstdosierung von ONO-AE-248. Analog wurden am Sprunggelenk  $27 \pm 41$  Impulse/15 sec als Baselineaktivität ermittelt und im Gegenzug  $7 \pm 10$  Impulse/15 sec für die letzten 5 Reizblöcke. Abbildung 10 und Tabelle 12 spiegeln die Ergebnisse grafisch und tabellarisch wieder.



**Abbildung 10:** Einfluss von ONO-AE-248 am Tag 21 nach Arthritisinduktion.

Zunächst wurde für 30 min die Baseline mittels Tyrodelösung ermittelt. In der linken Grafik entspricht jeder Punkt dem Mittelwert  $\pm$  SEM der Entladungsrate von 6 Neuronen in Impulsen/15 sec nach Abzug der mittleren Aktivität vor Substanzapplikation für innoxische (■, innoc) und noxische (▲, nox) Reizung an Knie (knee), Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw). Die rechte Grafik zeigt die dazu entsprechend vereinfachte Darstellung unter Ausschluss der Ergebnisse für die Pfotenstimulation. Hierbei wurden die Werte aus je 5 Reizblöcken gemittelt und dargestellt.

**Tabelle 12:** Antwortverhalten spinaler Neurone unter ONO-AE-248 am Tag 21 nach Arthritisinduktion. Gelistet sind die Mittelwerte der Impulse/15 sec Reizapplikation und deren Standardabweichung (SDM) von 6 Neuronen auf nicht noxische (innoc) und noxische (nox) Reizung von Knie (KG)- und Sprunggelenk (SG). Bis auf die Antworten der Baseline (6 Reizblöcke) wurden die Werte unter ONO-AE-248 aus je 5 Reizblöcken gemittelt.

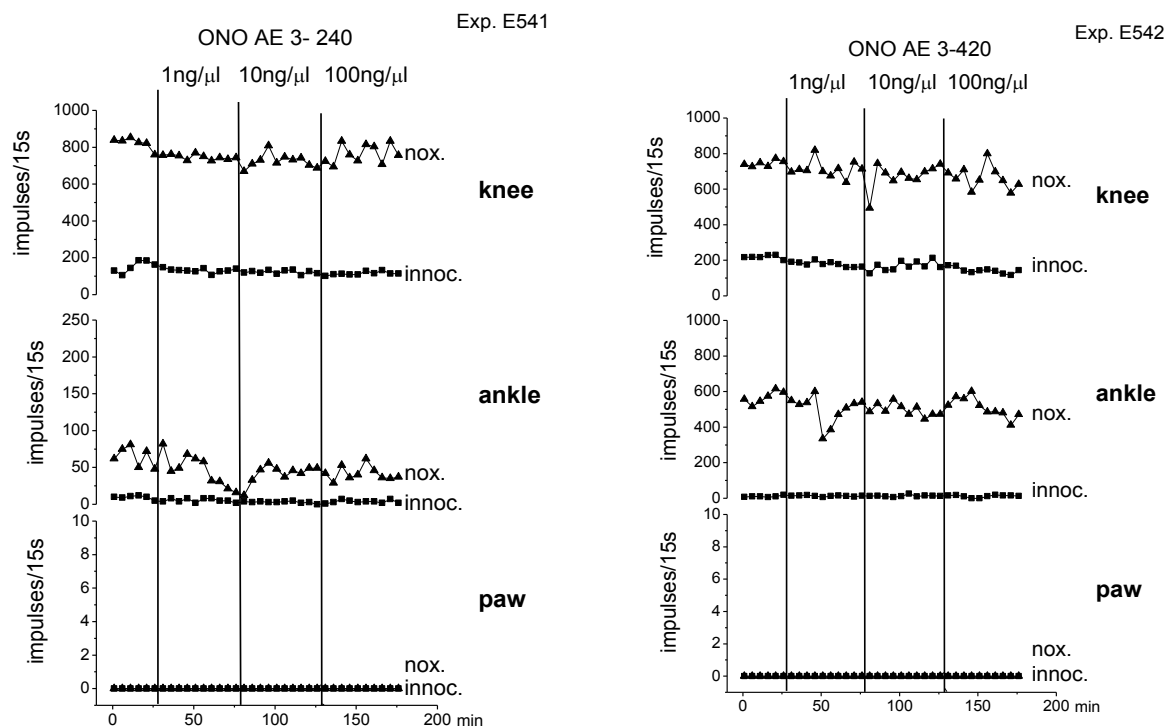
Testsubstanz Stimulus	Vehikel (0-30')	ONO-AE-248					
		1 ng/μl (30-55')		10 ng/μl (80-105')		100 ng/μl (130-55') (155-80')	
KG innoxisch	46 $\pm$ 41	52 $\pm$ 48	44 $\pm$ 40	37 $\pm$ 37	25 $\pm$ 26	17 $\pm$ 19	12 $\pm$ 13
KG noxisch	596 $\pm$ 194	544 $\pm$ 172	477 $\pm$ 185	386 $\pm$ 177	320 $\pm$ 188	239 $\pm$ 162	185 $\pm$ 134
SG innoxisch	27 $\pm$ 41	19 $\pm$ 22	16 $\pm$ 19	13 $\pm$ 15	9 $\pm$ 14	7 $\pm$ 9	7 $\pm$ 10
SG noxisch	262 $\pm$ 48	258 $\pm$ 225	221 $\pm$ 217	210 $\pm$ 237	176 $\pm$ 203	140 $\pm$ 155	125 $\pm$ 143

### **5.5 Einfluss des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240 auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen am Tag 3 nach Arthritisinduktion**

Nachdem wir den EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 getestet hatten, untersuchten wir exemplarisch, ob es zu einer Änderung des Antwortverhaltens spinaler Neurone unter dem EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240 am Tag 3 nach Arthritisinduktion kommen würde. Hierfür wurden zum einen 2 Einzelexperimente mit ONO-AE3-240 durchgeführt, zum anderen 3 Experimente inklusive der Testung der verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten.

Für die Einzelexperimente wurde nach Etablierung der Baseline für 30 min mit dem Substanzlösungsmittel ONO-AE3-240 in aufsteigender Dosierung von 1, 10 und 100 ng/μl für jeweils 10 Reizblöcke getestet. In Abbildung 11 sind die dazugehörigen Experimente E 541 und E 542 grafisch wiedergegeben. Dabei entspricht jeder Punkt der tatsächlichen Entladungsrate des abgeleiteten Hinterhornneurons auf innoxische und noxische Knie-, Sprunggelenks und Pfotenstimulation. Das receptive Feld beider Neurone umfasste das Knie- und Sprunggelenk, auf Pfotenstimulation erfolgte keine Antwort.

Die Grafiken betrachtend, scheint es unter innoxischer Knie- und Sprunggelenksreizung zu keiner offensichtlichen Beeinflussung des Antwortverhaltens in beiden Experimenten zu kommen. Demgegenüber erscheint die Entladungsrate der abgeleiteten Neurone auf noxische Reizapplikation an Knie- und Sprunggelenk unter dem EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten im Verlauf beider Experimente tendenziell abzunehmen. Begutachtet man die gemittelten Entladungsraten in Tabelle 13, so wird dieser Sachverhalt bestätigt. Betrug beispielsweise im Experiment E 542 die Entladungsrate auf noxische Kniegelenksstimulation unter Baselineaktivität im Mittel 745,33, so kam es bereits unter der niedrigsten Konzentration von 1 ng/μl ONO-AE3-240 zu einem Abfall auf 712,5, unter 10 ng/μl betrug die Entladungsrate 674,3 und unter 100 ng/μl 664,3. Bis auf die noxische Stimulation am Kniegelenk im Experiment E 541, schien auch die noxische Stimulation am Sprunggelenk bei beiden Experimenten zu einem dosisabhängigen Abfall der Spikes zu führen. Die übrigen Werte sind in Tabelle 13 ersichtlich. Aussagen über eine statistische Signifikanz lassen sich jedoch aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht treffen.



**Abbildung 11:** Einfluss von ONO-AE3-240 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Die Testung erfolgte in aufsteigender Dosierung von 1, 10 und 100 ng/μl. Jeder Punkt entspricht der tatsächlichen Entladungsrate des abgeleiteten Neurons pro 15 sekundiger Reizapplikation (▲ noxisch, ■ innoxisch) an Knie (knee)- und Sprunggelenk (ankle). Das RF beschränkte sich auf das Knie- und Sprunggelenk, weshalb Pfotenstimulation (paw) keine Entladungen erzeugte.

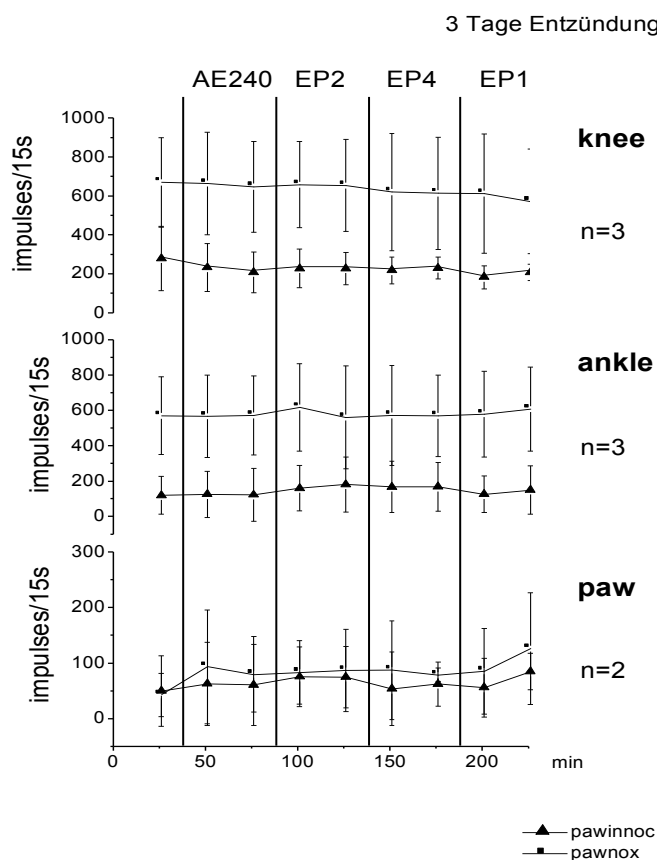
**Tabelle 13:** Antwortverhalten von 2 Neuronen unter ONO-AE3-240 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Angegeben sind die jeweils gemittelten Entladungsraten jedes einzelnen Neurons in Impulsen/15 sec auf nicht noxische (innoc) und noxische (nox) Reizung von Knie (KG)- und Sprunggelenk (SG) unter Vehikelzusatz („V“) und ONO-AE3-240 in aufsteigender Konzentration von 1, 10 und 100 ng/μl. Für das Vehikel wurden jeweils die Werte aus 6 Stimulationen, für die Testsubstanz aus jeweils 10 Stimulationen gemittelt.

Substanz Stimulus		E 541				E 542			
		ONO-AE3-240 in ng/μl				ONO-AE3-240 in ng/μl			
		„V“	1	10	100	„V“	1	10	100
Impulse/ 15 sec	KGinnoc	152,50	132,00	123,20	115,20	218,83	179,20	168,70	143,40
	nox	822,17	746,90	724,40	765,20	745,33	712,50	674,30	664,30
	SGinnoc	9,50	5,40	3,10	3,80	11,00	13,20	13,40	12,00
	nox	64,67	46,40	41,90	41,60	567,67	498,60	495,70	511,70



Wie bereits erwähnt, prüften wir in einem anderen Testprotokoll den EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten zusammen mit den verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten. Hierfür wurden nochmals 3 Experimente durchgeführt. Auf das Wirkprofil der EP-Rezeptor-Agonisten wurde bereits in Abschnitt 5.3 eingegangen und wird hier nicht erneut erläutert.

Nach Baselineetablierung mit dem Substanzlösungsmittels wurde ONO-AE3-240 in einer Konzentration von 100 ng/μl spinal appliziert und für 10 Testblöcke der Prüfung unterzogen. Darauf folgend wurden die verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten ebenfalls zu je 10 Testblöcken untersucht. Abbildung 12 gibt das Testprotokoll grafisch wieder. Im Vergleich zur Baselineaktivität zeigte sich unter der Applikation des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ein Abfall der Entladungsrate um  $59 \pm 51$  bzw.  $13 \pm 18$  Entladungen/15sec während innoxischer und noxischer Reizung am Kniegelenk. Stimulation am Sprunggelenk bewirkte eine Steigerung der Antworten um  $4 \pm 32$  (innoxisch) bzw. einem Abfall um  $1 \pm 7$  Spikes/15 sec (noxisch) und für die Pfotenstimulation lies sich eine tendenzielle Steigerung der Antworten gegenüber der Grundaktivität feststellen, wobei hier nur 2 Neurone in die Auswertung eingingen. Die korrespondierenden Werte sind in Tabelle 14 wiedergegeben.



**Abbildung 12:** Einfluss von ONO-AE3-240 und den verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Die Substanzen wurden zu jeweils 10 Testblöcken getestet. Jeder Punkt

entspricht dabei den gemittelten Antworten  $\pm$  SEM aus je 5 Reizblöcken auf innoxische ( $\blacktriangle$ ) und noxische ( $\blacksquare$ ) Stimulation von Kniegelenk (knee), Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw). Für die Baseline wurden die Werte aus 6 Reizblöcken gemittelt.

Tabelle 14: Antwortverhalten spinaler Neurone unter ONO-AE3-240 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SDM von 3 Neuronen unter innoxischer (innox) und noxischer (nox) Stimulation an Kniegelenk (KG), Sprunggelenk (SG) und Pfote (P) in Impulsen/15sec Reizapplikation. Für das Vehikel wurden die Mittelwerte aus 6 Reizblöcken ermittelt, für ONO-AE3-240 aus je 10 Testblöcken.

Stimulus		Vehikel	100 ng/ $\mu$ l ONO-AE3-240
Impulse/15 sec	<b>KG</b> innox	288 $\pm$ 165	229 $\pm$ 114
	nox	678 $\pm$ 230	665 $\pm$ 248
	<b>SG</b> innox	129 $\pm$ 108	133 $\pm$ 140
	nox	579 $\pm$ 220	578 $\pm$ 227
	<b>P</b> innox	53 $\pm$ 63	65 $\pm$ 74
	nox	46 $\pm$ 39	90 $\pm$ 85

## 5.6 Einfluss verschiedener COX-Hemmer auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen im Verlauf einer Arthritis

Für diese Versuchsserie wurden insgesamt 18 Tiere verwendet. Davon kamen 10 Tiere mit einer akuten (2 Tiere am Tag 1 und 7 Tiere am Tag 3) sowie 9 Tiere mit einer chronischen Entzündung zum Einsatz.

In Experimenten von Telleria-Diaz et al. zeigte sich, dass während einer etablierten Entzündung nur ein selektiver COX-2 Hemmer das Antwortverhalten von spinalen Hinterhornneuronen hemmen konnte, nicht aber ein unselektiver COX-Hemmer (Telleria-Diaz et al. 2010). Wir gingen der Fragestellung nach, welche Effekte unselektive (Indomethacin, Diclofenac) und selektive COX-Hemmer (NS-398) zu o.g. Zeitpunkten einer Arthritis auf die Reizverarbeitung im Rückenmark zeigen und ob sich Unterschiede zwischen einer akuten und chronischen Arthritis ableiten ließen.

Zunächst wurde erneut eine stabile Grundaktivität (Baseline) des Neurons ermittelt, indem das Lösungsmittel der Testsubstanz auf das freigelegte Rückenmark aufpipettiert und das Neuron solange abgeleitet wurde, bis eine relativ gleich bleibende Aktivität verteilt auf 6 zusammenhängende Reizblöcke a 5 min (30min) zu verzeichnen war. Daraufhin wurde das Lösungsmittel aus dem Pool entfernt und durch Indomethacin (8 mM) bzw. Diclofenac (3 mM) ersetzt. Nachdem die Reizserie mit dem unselektiven COX-Inhibitor beendet war,

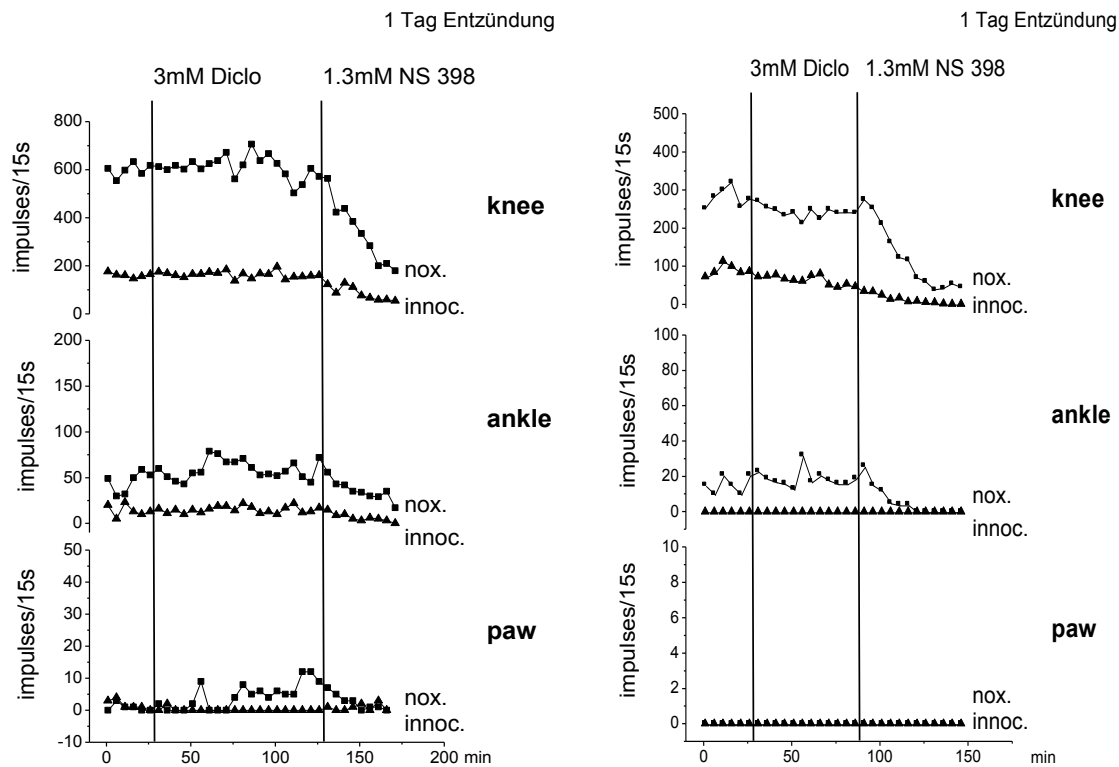
wurde der Pool mehrfach mit Tyrodelösung gewaschen und mit NS-398 (1.3 mM) gefüllt. Die Ableitung der neuronalen Aktivität erfolgte an ein und demselben Neuron.

### 5.6.1 Effekt von Diclofenac und NS-398 am Tag 1 nach Arthritisinduktion

Wie bereits oben erwähnt, konnte die Arbeitsgruppe um Telleria-Diaz et al. bei einer etablierten Arthritis (K/C-induziert) eine signifikante Absenkung der Entladungsraten unter dem spinalen Zusatz von NS-398 verzeichnen während die unselektiven COX-Hemmer Indomethacin und Diclofenac wirkungslos blieben (Telleria-Diaz et al. 2010). Da in diesen Experimenten bereits eine ausreichend hohe Fallzahl bestand, verzichteten wir auf größere, statistisch sichere Anzahl von Experimenten. Abbildung 13 beinhaltet die Einzelexperimente E 22 und E 25, wobei der Einfluss von Diclofenac und NS-398 auf die nozizeptive Reizverarbeitung grafisch wiedergegeben wird. Während im Experiment E 22 Diclofenac sowie NS-398 für jeweils 12 Reizblöcke auf dem Rückenmark belassen wurden, setzt sich das Protokoll der Testreihe E 25 aus 20 Blöcken Diclofenac und 9 Blöcken NS-398 zusammen. Da sich erfahrungsgemäß eine mögliche Substanzwirkung nach spätestens 5 Reizblöcken einstellt, ist diese Abweichung im Protokoll für die Bewertung des Wirkungsprofils beider Substanzen vernachlässigbar.

Nach Etablierung der Baseline mittels Tyrodelösung zeigte sich, wie bei den Ergebnissen Telleria-Diaz et al., unter der Einwirkung von Diclofenac keine eindeutige Änderung der Spikeanzahl pro Reizblock sowohl auf noxische als auch auf innoxische Reizung von Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote. Es kam weder zu einer Absenkung noch Steigerung der Reizantworten. Hingegen führte bei beiden Experimenten die folgende Applikation des selektiven COX-2 Hemmers NS-398 zu einer deutlichen Absenkung der Reizantworten auf noxische Stimulation von Knie- und Sprunggelenk sowie ebenso zu einer tendenziellen Verringerung der Spikeanzahl auf innoxische Reizung des Kniegelenkes in E 22 und E 25 sowie auf Kompression des Sprunggelenkes in E 22. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die aus je 6 Reizblöcken im Experiment E 22 und je 5 im Experiment E 25 errechneten Mittelwerte beider Experimente. Für die Baseline wurde der Mittelwert aus 6 Reizblöcken errechnet. Lag beispielsweise die Entladungsrate auf noxische Kniekompression im Experiment E 25 im Mittel bei 610 Spikes/15 sec unter Diclofenac, so konnte sie bereits innerhalb der ersten 5 Reizblöcke unter NS-398 um fast 1/3 auf 428,8 und in den darauf folgenden 5 Blöcken um etwa ein weiteres Drittel auf 205 Spikes/15 sec reduziert werden. Statistische Signifikanz ließ sich auch hier aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht errechnen.

Deskriptiv lässt sich jedoch eine fast sofortige Absenkung des Entladungsverhaltens mit einem nahezu linearen Abfall nach Applikation des selektiven COX-2 Hemmers beschreiben.



**Abbildung 13:** Einfluss von Diclofenac und NS-398 am Tag 1 nach Arthritisinduktion. Links das Experiment E 25, rechts das Experiment E 22. Jeder Punkt gibt die tatsächliche Entladungsrate des abgeleiteten Neurons pro 15 sec innoxischer (▲, innox) oder noxischer (■, nox) Reizapplikation an Knie (knee), Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw) unter Einwirkung des Vehikels Tyrodelösung, 3 mM Diclofenac und 1.3 mM NS-398 wieder.

**Tabelle 15:** Antwortverhalten spinaler Neurone unter Diclofenac und NS-398 am Tag 1 nach Arthritisinduktion. Dargestellt sind die Mittelwerte der aus je 5 (Testsubstanzen) bzw. 6 (Vehikel) Reizblöcken gemittelten Antworten des Experimentes E 25 in Impulsen/15 sec auf innoxische (innox) und noxische (nox) Reizung an Knie (KG)-, Sprunggelenk (SG) und Pfote. Für E 22 wurden die Mittelwerte aufgrund des abweichenden Testprotokolls sowohl für die Baseline als auch für die Testsubstanzen aus je 6 Reizblöcken ermittelt. Das receptive Feld des abgeleiteten Neurons von Experiment E 22 beschränkte sich zudem nur auf das Knie- und Sprunggelenk, weshalb die Werte für die Pfotenstimulation 0 betragen.

<b>E 25</b>		<b>KG</b> innox	<b>KG</b> nox	<b>SG</b> innox	<b>SG</b> nox	<b>Pfote</b> innox	<b>Pfote</b> nox
Mittelwert in Spikes/15 sec	Baseline	161,0	598,67	14,0	45,5	1,67	0,83
	Diclofenac_1	164,4	613,0	13,4	51,0	0,4	0,8
	Diclofenac_2	166,2	619,0	16,0	69,0	0	2,6
	Diclofenac_3	169,0	651,4	14,8	58,2	0	5,8
	Diclofenac_4	154,0	560,0	16,2	58,2	0	8,6
	NS-398_1	105,4	428,8	8,4	42,0	0,8	3,6
	NS-398_2	59,5	217,75	3,5	27,75	1	0,67

<b>E 22</b>		<b>KG</b> innox	<b>KG</b> nox	<b>SG</b> innox	<b>SG</b> nox	<b>Pfote</b> innox	<b>Pfote</b> nox
Mittelwert in Spikes/ 15 sec	Baseline	90,5	281,0	0	15,33	0	0
	Diclofenac_1	69,83	243,67	0	20,0	0	0
	Diclofenac_2	59,33	240,67	0	17,83	0	0
	NS-398_1	25,0	205,2	0	12,4	0	0
	NS-398_2	5,8	65,2	0	0,8	0	0

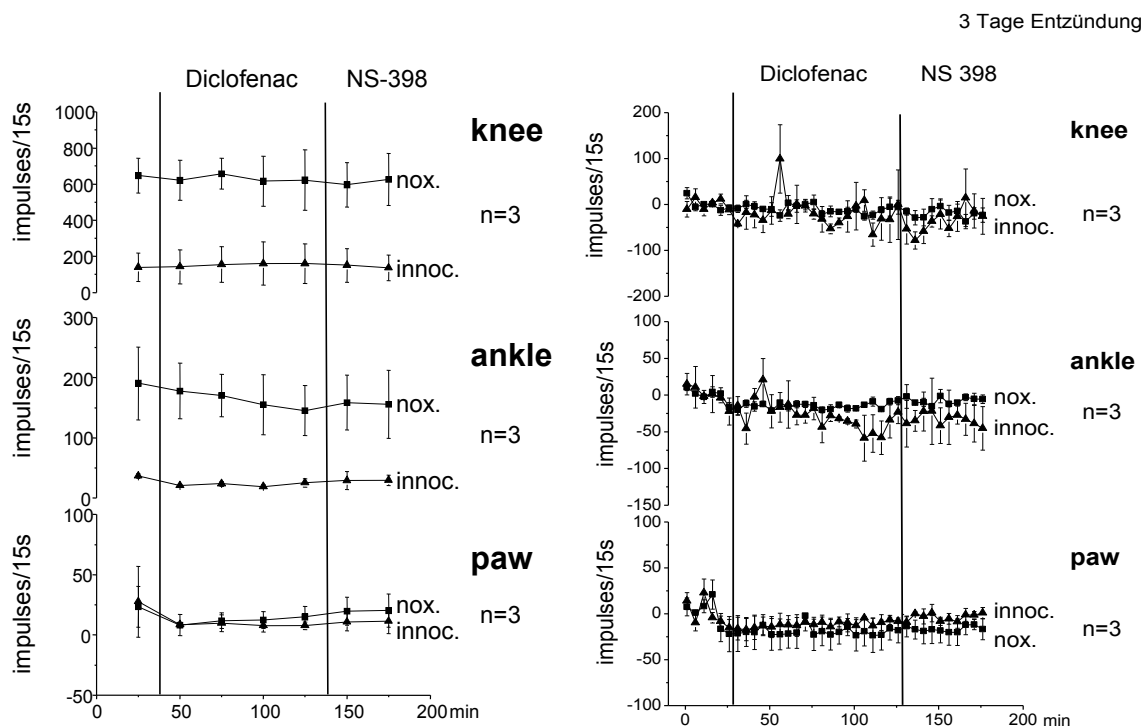
### 5.6.2 Effekt von Diclofenac, Indomethacin und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion

Nachdem, wie bei K/C-induzierter Arthritis, auch bei AI-Arthritis die Wirksamkeit selektiver COX-2 Hemmer und das Ausbleiben eines Effektes unselektiver NSAID gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage, inwieweit eine Beeinflussung der Neuronenaktivität während einer fortgeschrittenen akuten Entzündung stattfindet.

Das Testprotokoll gestaltete sich wie zuvor, d.h. nach der Aufzeichnung der Baselineaktivität unter Vehikelzusatz über 30 Minuten, wurde für 20 Reizblöcke der Einfluss spinal applizierten Diclofenacs (3 mM) und für weitere 10 Blöcke des selektiven COX-2 Hemmers NS-398 (1.3 mM) getestet. Hierfür kamen insgesamt 3 Tiere zum Einsatz. Exemplarisch wurde zudem bei einem Tier statt Diclofenac die Wirkung von Indomethacin (8 mM) getestet. Zusätzlich erfolgte anhand eines weiteren Testprotokolls bei drei Tieren die Prüfung von Indomethacin, NS-398 und Methanandamid (100 nM), einem Cannabinoidrezeptoragonisten, für jeweils 10 Reizblöcke.

Die grafische Darstellung für die Testung von Diclofenac und NS-398 ist in Abbildung 14 wiedergegeben. Abbildung 15 zeigt die Grafik des gleichen Testprotokolls inklusive der exemplarischen Testung mit Indomethacin. Dies spiegelt sich in einem veränderten n wieder (n=4). Betrachtet man Abbildung 14 und 15, so scheint das Antwortverhalten der abgeleiteten Hinterhornneurone für die Knie-, Sprunggelenks und Pfotenstimulation sowohl unter

Diclofenac/ Indomethacin als auch NS-398 nicht wesentlich beeinflusst zu werden. Lediglich unter noxischer Pfotenstimulation fällt in Abbildung 14 ein diskreter Abfall der Entladungsrate unter Diclofenac auf. Tabelle 16 gibt die dazugehörigen Mittelwerte  $\pm$  SDM wieder. Tendenziell zeigt sich sowohl unter innoxischer als auch noxischer Stimulation an allen 3 Reizorten ein diskreter Abfall der Spikeanzahl. Wurde beispielsweise für die noxische Reizung am Kniegelenk eine Grundaktivität von  $647 \pm 95$  Entladungen/15 sec ermittelt, so betrug diese unter Diclofenac  $639 \pm 98$  bzw.  $619 \pm 154$  und für NS-398  $612 \pm 133$ . Am offensichtlichsten wurde dies unter noxischer Sprunggelenksstimulation. Hier betrug die Baselineaktivität  $191 \pm 60$  Spikes/ 15sec während unter Diclofenac ein Abfall auf  $174 \pm 40$  bzw.  $150 \pm 43$  und unter NS-398  $157 \pm 51$  Entladungen/15 sec verzeichnet werden konnten. Statistische Signifikanz ließ sich aufgrund der geringen Fallzahl nicht errechnen.



**Abbildung 14:** Einfluss von Diclofenac und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. In der linken Grafik entspricht jeder Punkt dem Mittelwert  $\pm$  SEM der Entladungen auf nicht schmerzhafte ( $\blacktriangle$ , innoc) und schmerzhafte ( $\blacksquare$ , nox) Reizung an Knie (knee)-, Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw) unter Einfluss von Tyrodelösung, Diclofenac und NS-396. Für die Baseline wurden die Werte aus 6 Reizblöcken gemittelt, für Diclofenac und NS-398 aus jeweils 5 Reizblöcken. In der rechten Grafik entspricht jeder Punkt dem Mittelwert  $\pm$  SEM abzüglich der Grundaktivität vor Substanzapplikation abgebildet.

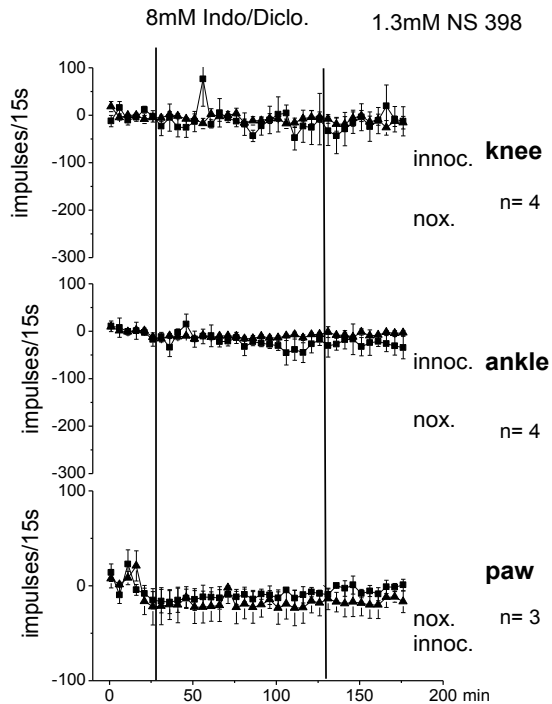


Abbildung 15: Einfluss von Diclofenac/Indomethacin und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SEM der Entladungen abzüglich der Baselineaktivität auf nicht schmerzhaft ( $\blacktriangle$ , innoc) und schmerzhaft ( $\blacksquare$ , nox) Reizung an Knie (knee)-, Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw). Die Testreihen für Diclofenac und Indomethacin wurden zusammengefasst, was sich in einem veränderten n widerspiegelt (n=4).

Tabelle 16: Entladungsverhalten spinaler Neurone unter Diclofenac und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SDM von 3 Neuronen auf innocische (innoc) und noxische (nox) Stimulation an Knie (KG)-, Sprunggelenk (SG) und Pfote (P) aus 6 (Baseline) bzw. je 10 (Testsubstanzen) Reizblöcken im Zeitverlauf in Impulsen/15 sec.

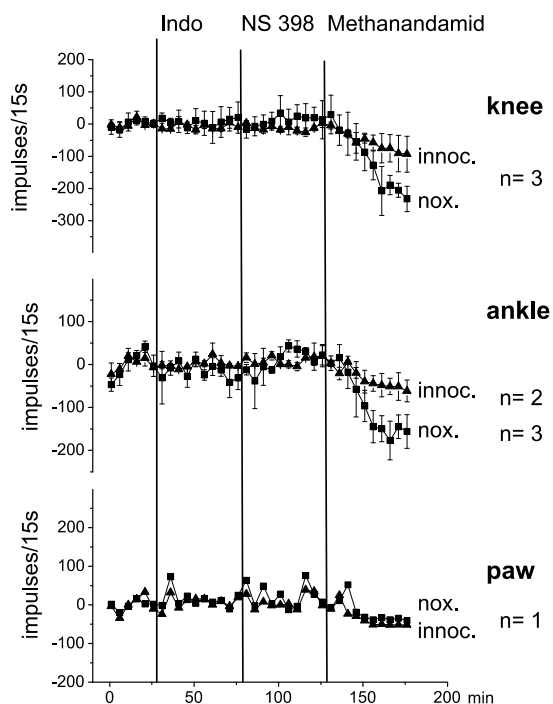
Stimulus Testsubstanz		Stimulus					
		KG innoc	KG nox	SG innoc	SG nox	P innoc	P nox
Impulse/15 sec	Baseline	166 $\pm$ 92	647 $\pm$ 95	37 $\pm$ 4	191 $\pm$ 60	28 $\pm$ 29	23 $\pm$ 17
	Diclo	160 $\pm$ 97	639 $\pm$ 98	22 $\pm$ 2	174 $\pm$ 40	9 $\pm$ 4	10 $\pm$ 8
	Diclo	151 $\pm$ 95	619 $\pm$ 154	22 $\pm$ 2	150 $\pm$ 43	8 $\pm$ 4	14 $\pm$ 7
	NS-398	146 $\pm$ 78	612 $\pm$ 133	29 $\pm$ 12	157 $\pm$ 51	11 $\pm$ 9	20 $\pm$ 13

Des Weiteren wurde an 3 zusätzlichen Versuchstieren ein abgeändertes Testprotokoll durchgeführt. Nach Etablierung einer stabilen Baseline (Lösungsmittel für Indomethacin) wurden für je 10 Testblöcke der unselektive COX-Hemmer Indomethacin und der selektive COX-2 Hemmer NS-398 getestet. Danach wurde der Rückenmarkspool mehrfach mit Tyrodelösung gespült und der Cannabinoid-Rezeptor-Agonist Methanandamid für ebenfalls 10 Testblöcke untersucht.

Im Vergleich zur Baselineaktivität kam es zu keiner wesentlichen Beeinflussung des Antwortverhaltens der nozizeptiven Neurone auf innocische und noxische Stimulation an

Knie-, Sprunggelenk und Pfote sowohl unter Indomethacin als auch NS-398. Für innoxische Kniestimulation wurde ein diskreter Abfall der Antwortraten um  $7 \pm 1$  (Indomethacin) und  $11 \pm 0$  (NS-398) beobachtet. Bei noxischer Kniestimulation zeigte sich eine Steigerung um  $7 \pm 34$  (Indomethacin) und  $11 \pm 29$  (NS-398) Spikes/15sec. Analog kam es unter innoxischer Sprunggelenksreizung zu einer minimalen Steigerung der Antworten unter Indomethacin und NS-398 sowie unter noxischer Reizung zu einem diskreten Abfall (Indomethacin) und Anstieg (NS-398). Die gemittelten Werte sind in Tabelle 17 ersichtlich.

Im Gegensatz hierzu konnte unter Methanandamid eine deutliche und markante Reduktion der Entladungen auf innoxische und noxische Knie- und Sprunggelenksmanipulation bereits während der ersten Reizblöcke erzielt werden. Betrug die Grundaktivität für innoxische und noxische Kniereizung  $146 \pm 151$  (innoc) und  $591 \pm 125$  (nox), so war sie unter Methanandamid zum Ende deutlich reduziert auf  $68 \pm 74$  (innoc) und  $399 \pm 182$  (nox) Spikes/15 sec. Bei innoxischer und noxischer Sprunggelenksstimulation wurden  $70 \pm 38$  (innoc) und  $405 \pm 249$  (nox) Spikes/15 sec für die Baseline ausgezählt, während unter Methanandamid eine Reduktion auf  $19 \pm 4$  (innoc) und  $251 \pm 191$  (nox) Spikes/15 sec erzielt wurde. Abbildung 15 gibt die Ergebnisse graphisch wieder.



**Abbildung 16:** Einfluss von Indomethacin, NS-398 und Methanandamid (MA) am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SEM abzüglich der Baselineaktivität auf innoxische ( $\blacktriangle$ , innoc) und noxische ( $\blacksquare$ , nox) Reizung an Knie (knee)-, Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw) in Impulsen/15 sec von insgesamt 3 Neuronen. Zu beachten ist, dass nicht jedes der 3 Neurone Signaleingang aus Sprunggelenk und Pfote hatte, was sich in einem veränderten n widerspiegelt.

**Tabelle 17:** Antwortverhalten spinaler Neurone unter Indomethacin, NS-398 und Methanandamid (MA) am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SDM von insgesamt 3 Neuronen auf innoxische (innoc) und noxische (nox) Reizung an Knie (KG)- und Sprunggelenk (SG) aus je 6 (Baseline) bzw. 10 (Indomethacin und NS-398) und 2 x je 5 (Methanandamid) Reizblöcken in



Impulsen/15 sec. Die Ergebnisse für die Pfotenstimulation wurden aufgrund der niedrigen Fallzahl (n=1) nicht mit abgebildet.

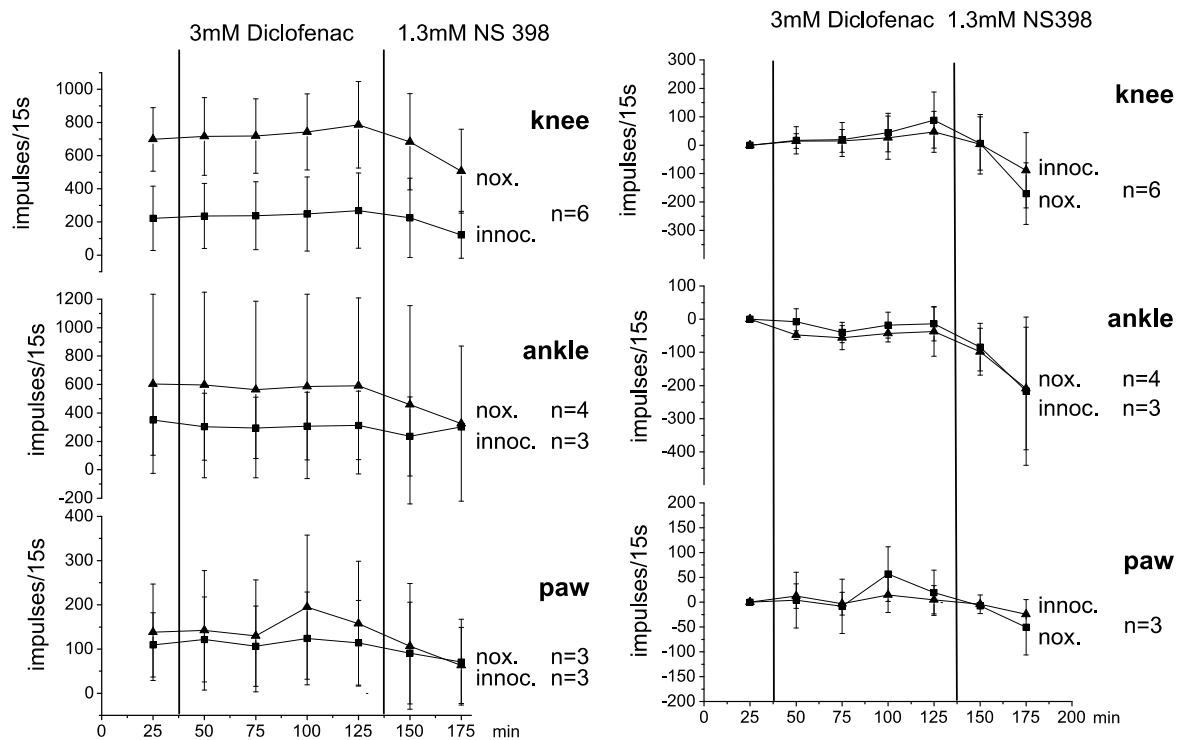
Testsubstanz Stimulus		Baseline	Indomethacin	NS-398	MA	MA
Impulse/15 sec	KG innox	146±151	139±152	135±151	115±136	68±74
	nox	591±125	598±159	602±154	559±179	399±182
	SG innox	70±38	71±48	79±48	56±2	19±4
	nox	405±249	389±233	414±226	374±194	251±191

### 5.6.3 Effekt von Diclofenac und NS-398 am Tag 21 nach Arthritisinduktion

An insgesamt 6 Tieren wurde der Fragestellung nachgegangen, inwiefern unselektive und selektive COX-Hemmer unter chronischen Entzündungsbedingungen die neuronale Aktivität von Hinterhornneuronen beeinflussen

Nach Etablierung der Grundaktivität, wurde für 20 Reizserien der unselektive COX-Hemmer Diclofenac und nachfolgend für 10 Reizserien der selektive COX-2 Hemmer NS-398 untersucht. Abbildung 16 illustriert das Antwortverhalten der abgeleiteten Neurone. Wie bereits am Tag 1 und 3 nach Arthritisinduktion beobachtet, kam es innerhalb der ersten 100 Minuten unter der spinalen Applikation von Diclofenac zu keiner signifikanten Modifikation der Grundaktivität auf noxische und nicht noxische Reizung sowohl des entzündeten Kniegelenkes als auch des nicht entzündeten Sprunggelenkes sowie der Pfote. Wurden für innoxische Stimulation während der Baselineetablierung im Mittel  $222 \pm 193$  am Knie,  $350 \pm 248$  am Sprunggelenk und  $109 \pm 73$  Impulse/15 sec an der Pfote erreicht, so kam es unter der spinalen Applikation von Diclofenac zu keiner bedeutsamen Veränderung der Antworten (Steigerung um  $26 \pm 178$  am Knie, Abfall um  $46 \pm 237$  am Sprunggelenk, Steigerung um  $8 \pm 67$  Impulse/15 sec an der Pfote). Ebenso ließ sich durch schmerzhafte Reizung keine signifikante Veränderung der Entladungsrate am Knie (Steigerung um  $43 \pm 175$ ), Sprunggelenk (Abfall um  $20 \pm 612$ ) und Pfote (Steigerung um  $18 \pm 94$  Impulse/15 sec) gegenüber der Baselineaktivität ermitteln. Nach Entfernen des Diclofenac und mehrmaligem Waschen des Rückenmarkpools wurde nun der selektive COX-2 Hemmer NS-398 zugegeben. Interessanterweise stellte sich hierunter, wie schon am Tag 1 beobachtet, eine nahezu kontinuierliche Absenkung der neuronalen Entladungsrate ein, sowohl auf innoxische als auch auf noxische mechanische Reizung an Knie-, Sprunggelenk und Pfote. Verglichen zur Baselineaktivität wurden während der letzten 5 Testblöcke die Antworten auf innoxische

Stimulation an Knie-, Sprunggelenk und Pfote im Mittel um  $99 \pm 52$ ,  $226 \pm 85$  und  $38 \pm 24$  Entladungen/15 sec Reizapplikation durch den selektiven COX-2 Hemmer reduziert. Unter noxischer Reizung kam es zu einer Absenkung um  $191 \pm 62$ ,  $280 \pm 85$  und  $75 \pm 23$  Impulsen/15 sec an Knie-, Sprunggelenk und Pfote. Statistische Signifikanz ließ sich für dieses Zeitintervall jedoch nur für die noxische und innoxische Reizung am Knie ermitteln (Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben,  $p < 0,05$ ). Die korrespondierenden Werte sind in Tabelle 18 aufgelistet.



**Abbildung 17:** Einfluss von Diclofenac und NS-398 am Tag 21 nach Arthritisinduktion. In der linken Grafik entspricht jeder Punkt dem Mittelwert  $\pm$  SEM der Entladungen auf nicht schmerzhaft (▲, innox) und schmerzhaft (■, nox) Reizung an Knie (knee)-, Sprunggelenk (ankle) und Pfote (paw) von 6 abgeleiteten Neuronen in Impulsen/15 sec. In der rechten Grafik sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM abzüglich der Grundaktivität vor Substanzapplikation abgebildet. Nicht alle 6 Neurone hatten rezeptiven Input aus dem Sprunggelenk und der Pfote, was in einem veränderten n ersichtlich wird.

\*  $p < 0,05$  (Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben).

**Tabelle 18:** Antwortverhalten spinaler Neurone unter Diclofenac und NS-398 am Tag 21 nach Arthritisinduktion. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SDM auf innoxische (innox) und noxische (nox) Reizung an Knie (KG)-, Sprunggelenk (SG) und Pfote (P). Für Diclofenac wurde vereinfachend der Mittelwert aus den gesamten 20 Reizblöcken gebildet. Für NS-398 wurden die Werte aus je 5 Reizblöcken gemittelt.

Stimulus Substanz		KG innox	KG nox	SG innox	SG nox	P innox	P nox
Impulse/15 sec	Baseline	222±193	698±191	350±248	604±630	109±73	138±109
	Diclofenac	248±15	741±16	304±11	584±18	117±6	156±15
	NS-398	225±240	684±289	235±277	457±697	91±115	106±142
	NS-398	123±141	507±253	124±163	324±545	71±97	63±86

## 6. Diskussion

### 6.1 Selektivität der Prostaglandinrezeptoragonisten und -antagonisten sowie der COX-Inhibitoren

Prostaglandine und ihre Analoga üben ihre Wirkung über verschiedene Rezeptortypen und -subtypen aus, weshalb die Bestimmung der jeweiligen Bindungsaffinitäten der Substanzen zu einem Rezeptor relativ schwierig ist. Erst das molekulare Klonen der einzelnen Prostaglandinrezeptorsubtypen hat die homogene Expression eines jeden Rezeptors in kultivierten Zellen und dadurch die Analyse ihrer Ligandbindungseigenschaften ermöglicht (Kiriya et al. 1997). Jedoch kommen auch hier zu einem Unterschiede innerhalb der verschiedenen Spezies in der Gewebeverteilung der Rezeptoren und zum anderen der Ligandenaffinität hinzu. Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) der verschiedenen Prostaglandine und Prostaglandinanaloga, als Maß für die Bindungsaffinität zum Rezeptor, ergab für eine Reihe von Substanzen der neuen Generation unter anderem folgende Werte und Charakteristika:

- **EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-DI-004:** Hoch selektiver Agonist am EP<sub>1</sub>-Rezeptor mit einer  $K_i$  von 150 nM und einer EC<sub>50</sub> von 420 nM (Yamamoto et al. 1999).
- **EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist Butaprost:** Butaprost zeigt eine signifikante Affinität für den Maus EP<sub>2</sub>-Rezeptor mit einer  $K_i$  von 110 nM und wird als klassischer EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist verwendet (Narumiya et al. 1999, Tsuboi et al. 2002).
- **EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE-248:** ONO-AE-248 zeigt nur für den EP<sub>3</sub>-Rezeptor eine hohe Affinität mit einer Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 15 nM (Yamamoto et al. 1999) bzw. 7,5 nM (Ikeda-Matsuo et al. 2010) und einer EC<sub>50</sub> von 5,2 nM (Yamamoto et al. 1999).
- **EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist ONO-AE3-240:** Antagonist am EP<sub>3</sub>-Rezeptor mit einem  $K_i$ -Wert von 0,23 nM (Ikeda-Matsuo et al. 2010).
- **EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE1-329:** Spezifischer EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist mit einem  $K_i$ -Wert von 9,7 nM und einer EC<sub>50</sub> von 3,1 nM (Yamamoto et al. 1999).

Der EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist wurde in unseren Experimenten in einer Konzentration von 100 ng/μl (2,36 mM) verwendet. Der EC<sub>50</sub>-Wert beträgt im Vergleich hierzu 0,42 μM (420 nM). Analog betrug die Konzentration für den EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten 100 ng/μl (2,44 mM) bei einem EC<sub>50</sub>-Wert von 5 μM. Der EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist wurde in einer Konzentration von 1 (26,28 μM), 10 (262,8 μM) und 100 ng/μl (2,628 mM) verwendet und hat eine EC<sub>50</sub> von 5,2

nM (0,0052  $\mu$ M). Entsprechend wurde der EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist in einer Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l (2,199 mM) getestet bei einer EC<sub>50</sub> von 3,1 nM (0,0031 $\mu$ M). Inwieweit die Substanzkonzentration mit zunehmender Ableittiefe der Hinterhornneurone abnimmt, ist unklar. Jedoch waren die hier verwendeten Substanzkonzentrationen der verschiedenen EP-Agonisten alle deutlich höher, als die angegebenen mittleren effektiven Konzentrationen, angegeben als EC<sub>50</sub>-Wert. Betrachtet man zusätzlich die Ergebnisse von Bär et al., so konnte ein deutlicher Effekt der verschiedenen EP-Agonisten, welche in der gleichen Konzentration verwendet wurden, auf die Exzitabilität naiver Hinterhornneurone nachgewiesen werden (Bär et al. 2004), sodass für unserer Experimente von einer gesicherten Rezeptorbindung und somit sicheren und effektiven Wirkkonzentration ausgegangen werden kann.

Wie bereits eingangs dargestellt, lassen sich die COX-Inhibitoren in vier verschiedene Klassen einteilen (Lipsky et al. 1998). Schon bald nachdem beide COX-Isoformen sequenziert wurden, wurden eine Vielzahl an in vitro und in vivo Testsystemen entwickelt, um die Selektivität der Substanzen für die COX-1 und COX-2 zu bestimmen (Wallace 1999). Zu den verwendeten in vitro Assays gehören zum Beispiel isolierte rekombinante Enzyme von Mensch und Maus, Zellhomogenate, isolierte Zelllinien (Osteosarkom und Lymphom Zellreihen) und Zellen wie Makrophagen, Endothelzellen, Thrombozyten, Chondrozyten und Synoviazysten (Kulkarni et al. 2000). Dabei bestimmen die meisten Tests die IC<sub>50</sub>, d. h. die Konzentration der Substanz, die unter kontrollierten Bedingungen 50 % der Enzymaktivität der jeweiligen COX hemmt. Die IC<sub>50</sub> ist jedoch nur von Nutzen, um einen Vergleich der in vitro Selektivität innerhalb der COX-Inhibitoren zu erhalten, da die in vitro IC<sub>50</sub> einen schlechten Prädiktor der in vivo IC<sub>50</sub> darstellt (Wallace 1999). Abgesehen davon variieren die Angaben zur Selektivität der einzelnen COX-Inhibitoren teilweise extrem in Abhängigkeit vom verwendeten Testassay sowie von den Untersuchungsbedingungen (Inkubationszeit mit dem Inhibitor, Proteinbindung der getesteten Substanz, Ausgangskonzentration des Substrates, u.a.) (Wallace 1999, Kulkarni et al. 2000, Steinmeyer 2000). Erst durch die Entwicklung eines Vollblutessays durch Patrignani et al. wurde ein allgemein akzeptierter Goldstandard zur qualitativen Bestimmung der COX-2 Selektivität entwickelt (Schmidt & Geisslinger 2001). Er bestimmt die COX-1 bzw. COX-2 Selektivität anhand der Wirkstoffkonzentrationen, die notwendig sind, einerseits die COX-1 abhängige Thromboxansynthese in Thrombozyten und andererseits die COX-2 abhängige PGE<sub>2</sub>-Freisetzung in Monozyten zu hemmen (Patrignani et al. 1994). Zudem wird hier die Bindung der einzelnen Substanzen an Plasmaproteine mit einberechnet. Die Selektivität wird in der

IC<sub>50</sub> COX-2/ IC<sub>50</sub> COX-1 Ratio angegeben. Unter Berücksichtigung dieser Daten können die hier verwendeten Substanzen wie folgt charakterisiert werden:

- **Diclofenac:** unselektiver COX-Inhibitor (Warner et al. 1999, Kulkarni et al. 2000), der die monozytäre COX-2 ungefähr 10-20 fach stärker hemmt als die thrombozytäre COX-1 (Patrignani et al. 1997). Diese COX-2 präferentielle Wirkung besteht jedoch nur in niedrigen Dosierungen und geht mit ansteigenden Dosen verloren (Schmidt & Geisslinger 2001).
- **Indomethacin:** unselektiver COX-Inhibitor der die COX-1 und COX-2 mit ungefähr gleicher Potenz hemmt (Patrignani et al. 1994, Brideau et al. 1996, Warner et al. 1999) und dessen IC<sub>50</sub> beispielsweise im Vollblutessay  $0,70 \pm 0,20 \mu\text{M}$  für die COX-1 und  $0,36 \pm 0,10 \mu\text{M}$  für die COX-2 betrug (Patrignani et al. 1994).
- **NS-398:** potenter selektiver COX-2 Inhibitor, dessen Angaben zur Selektivität in Abhängigkeit vom verwendeten Essay zwischen 8- bis 400-facher Selektivität für die Hemmung der COX-2 schwanken (Brideau et al. 1996, Wallace et al. 1998, Warner et al. 1999, Kulkarni et al. 2000). So wurde zum Beispiel im Vollblutassay eine COX-1 IC<sub>50</sub> mit  $6,9 \mu\text{M}$  erreicht und mit  $0,35 \mu\text{M}$  eine IC<sub>50</sub> für die COX-2 (Warner et al. 1999).

Die topische Applikation von gelösten Substanzen auf das Rückenmark beeinflusst simultan verschiedene neuronale Kreise („circuits“), die am Antwortverhalten der untersuchten Neurone beteiligt sind (Nebe et al. 1997). Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass keine Aussage zum Angriffsort der verwendeten Wirkstoffe (präsynaptische Endigung oder postsynaptisches Neuron) gemacht werden kann (Nebe et al. 1997). Zudem ist es weiterhin unklar, in welchen Konzentrationen die spinal applizierten Mittel am Ort der Ableitung wirken. Jedoch ist davon auszugehen, dass die Konzentration der Testsubstanzen mit zunehmender Gewebetiefe abnimmt.

## 6.2 Präparation und Versuchsdurchführung

Bei allen Tieren wurde die gleiche Vorgehensweise der Präparation angewendet. Zuerst wurde eine entsprechende Dosis Thiopental i.p. appliziert, unter der zum einen eine schmerzfreie, möglichst atraumatische Präparation des Ableitgebietes durchgeführt werden konnte sowie eine ausreichende Narkosetiefe zur Durchführung der Experimente erreicht wurde. In der Regel kam es kaum zu stärkeren Blutverlusten. Wie bereits eingangs erwähnt, fiel durch das unerwartete Versterben eines Tieres zu Beginn der Untersuchungsreihe eine auffallend verstärkte Empfindlichkeit der Ratten mit induzierter Kniegelenksentzündung

gegenüber dem Narkosemittel Thiopental auf, was zu einer Reduktion der Einleitungsdosis zwang. Unter der angepassten Dosierung kam es zu keinem weiteren Zwischenfall. Ob dieser Zwischenfall speziell mit dem Narkotikum Thiopental assoziiert ist oder ob eine entzündlicher Prozess generell mit einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber Narkosemitteln im Allgemeinen verbunden ist, bleibt in diesem Falle ungeklärt.

Im Allgemeinen konnte für Thiopental ein hemmender Einfluss auf verschiedene nozizeptive Signaltransduktionswege im Rückenmark nachgewiesen werden (Jewett et al. 1992). Ein hemmender Effekt auf das Antwortverhalten der hier abgeleiteten spinalen Neurone kann somit nicht ausgeschlossen werden. Inwieweit dieser aber die erfassten Ergebnisse beeinflusst, bleibt unklar. Allerdings wurden alle Ableitungen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Zudem wurde durch die regelmäßige Kontrolle der Narkosetiefe und entsprechender Nachinjektion von Thiopental versucht, die Plasmaspiegel vom Thiopental möglichst stabil zu halten.

### **6.2.1 Standardisierung der Reizapplikation**

Mit der Haltevorrichtung und dem Stimulationsgerät für das Kniegelenk sowie den modifizierten Krokodilklemmen war eine Reizung von Knie- und Sprunggelenk sowie Pfote unter standardisierten Bedingungen gegeben. Diese Stimulationseinrichtung hat sich schon in einer Vielzahl von anderen Experimenten an diesem Institut bewährt und etabliert. Es wurde darauf geachtet, dass die Reizung stets an derselben Stelle erfolgte. Mit Hilfe des optischen und akustischen Signals konnten die Aktionspotentiale auf gleich bleibende Form, Größe und Frequenz kontrolliert werden. Im Falle einer abrupten Veränderung dieser Charakteristika aufgrund einer beispielsweise verstärkten Atemexkursion des Tieres wurde zum einen die korrekte Position des Beines in der Haltevorrichtung und zum anderen die exakte Lage der Ableitelektrode kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Kleinere Lageänderungen des Beines in der Haltevorrichtung mit konsekutiver Verschiebung des Reizortes am Kniegelenk sind trotzdem nicht vollständig auszuschließen.

### **6.2.2 Charakteristika der untersuchten Neurone**

Nozizeptive afferente Fasern terminieren im Hinterhorn des Rückenmarkes, welches aufgrund zytologischer Eigenschaften in 6 Laminae eingeteilt werden kann. Wie eine Reihe von Studien zeigen konnte, bilden Afferenzen des Kniegelenkes synaptischen Kontakt zu Neuronen der 2. Ordnung im Hinterhorn im Bereich L<sub>1</sub>-L<sub>6</sub> der Lendenwirbelsäule aus (Schaible et al. 1991, Neugebauer et al. 1994c, 1996a, Vasquez et al. 2001).

Schmerzverarbeitende Neurone sind vornehmlich im oberflächlichen Hinterhorn (Laminae I und II) aber auch im tiefen Hinterhorn (Laminae IV, V, VI) sowie im Vorderhorn (Laminae VII-VIII) identifiziert worden und erhalten direkten oder über Interneurone geschalteten indirekten Input aus A $\delta$ - und C-Fasern (Light & Perl 1979, Mense & Prabhakar 1986, Craig et al. 1988, Hoheisel et al. 1989, Hoheisel & Mense 1990, Basbaum & Jessel 1999). Der Einstrom erfolgt häufig konvergent aus Soma und Viszera bzw. Kniegelenk, Muskel und Haut (Schaible et al. 1986, 1987; Hoheisel & Mense 1990). Die Konvergenz des afferenten Einstroms erklärt teilweise die mitunter diffuse und schwer lokalisierbare Natur des Gelenkschmerzes (Schaible 1998). Generell werden die nozizeptive Signale über aufsteigende Bahnen (Tractus spinothalamicus, Tractus spinoretikularis, Tractus spinomesencephalicus, Tractus cervicothalamicus, Tractus spinohypothalamicus) an höher gelegene Zentren weitergegeben (Basbaum & Jessel 1999). Der Tractus spinothalamicus bezieht seine Axone aus WDR- und NS-Neuronen der Laminae I sowie V-VII (Basbaum & Jessel 1999). Neben der Einteilung der Hinterhornneurone in WDR- oder NS-Neurone können sie in Abhängigkeit ihrer projizierenden Axone in 3 Klassen eingeteilt werden: projizierende Neurone, propriospinale Neurone und lokale Interneurone (Doubell et al. 1999). Obwohl projizierende Neurone mit ihren Axonen die Information direkt an höher gelegene Zentren weitergeben (Schaible 1998), repräsentieren sie jedoch die Minderheit der Hinterhornneurone. Propriospinale Neurone transferieren ihre Signale von einem Segment im Rückenmark ins nächste und speisen so auf multisynaptischen Wege ihre Information ans Gehirn ein. Die Mehrheit der Neurone im Rückenmark wird hingegen von den lokalen Interneuronen gebildet (Doubell et al. 1999).

Wie bereits erwähnt, wurden die hier abgeleiteten Hinterhornneurone mit Afferenz aus dem ipsilateralen Kniegelenk im Bereich L<sub>1</sub>-L<sub>4</sub> aufgesucht und charakterisiert. Gelenkinput wurde angenommen, wenn das Neuron durch schmerzhaftes Pressen des Kniegelenkes aktiviert werden konnte, aber keine Antwort auf Streichen oder Kneifen der darüber liegenden Haut zeigte. Es wurden überwiegend WDR-Neurone in einer Tiefe von  $912,71 \pm 225,36 \mu\text{m}$  abgeleitet, also hauptsächlich im tiefen Hinterhorn (Laminae IV-VI, 565-1290  $\mu\text{m}$ ), was im Einklang mit früheren Untersuchungen zur Lokalisation von WDR-Neuronen steht und die Bedeutung dieser Laminae als Schaltstelle der nozizeptiven Informationsintegration unterstreicht (Schaible et al 1987, Neugebauer & Schaible 1990). Obwohl im oberflächlichen Hinterhorn (Laminae I und II) ebenfalls nozizeptive Inputs verarbeitet werden, wurden Neurone aus dieser Schicht nicht zur Ableitung herangezogen. Sie zeigen häufig starken konvergenten Einstrom kutaner Afferenzen und erschweren dadurch die Interpretation der



Ergebnisse aus Stimulation des entzündeten Kniegelenkes (Neugebauer et al. 1994c). Anhand des Schrittmotors konnte die Tiefe der abgeleiteten Neurone abgelesen werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die Carbonfaserelektrode unter mikroskopischer Sicht genauestens auf die Oberfläche des Rückenmarks aufgesetzt wird. Mit Hilfe histologischer Untersuchungen zur Korrelation zwischen am Schrittmotor abgelesener Tiefe und tatsächlicher Tiefe konnte in früheren Studien die Validität dieser Methode zur Bestimmung der Neuronenlokalisation bestätigt werden (Grubb et al. 1993). Es ist also bei den hier abgeleiteten Neuronen davon auszugehen, dass sie tatsächlich im Bereich des tiefen Hinterhorn lokalisiert waren. Aufgrund der Tatsache, dass jedoch nur ein geringer Teil der Hinterhornneurone direkt in rostral gelegene Zentren projiziert und Interneurone die Mehrheit der Rückenmarksneurone bildet, scheint das Gros der Neurone dieser Arbeit ebenfalls Interneurone gewesen zu sein.

### **6.3 Arthritismodelle: Modell der Antigen-induzierten Arthritis**

Tiermodelle zur Rheumatoiden Arthritis (RA) sind potente Werkzeuge, um zum einen die Immunpathologie der chronisch entzündlichen Synovialitis und zum anderen die neurobiologischen Grundlagen jener Schmerzgenese zu studieren. Obwohl mehr als 8 Tiermodelle bisher beschrieben wurden, sind es v.a. die Adjuvans-induzierte, Streptokokkenzellwand-induzierte sowie die Antigen-induzierte Arthritis, die entscheidende Einblicke in die Genese der Rheumatoiden Arthritis erbracht haben (Brahm 1991). Die Antigen-induzierte Arthritis teilt dabei viele Aspekte der humanen RA und ist aufgrund dessen ein häufig angewendetes Modell zur Untersuchung von Pathomechanismen und Validierung von Therapiestrategien (Segond von Banchet et al. 2000, Bendele 2001, Schurigt et al. 2005). Zudem hat dieses Modell den Vorteil, genau definierte Entzündungsstadien in Bezug auf die intraartikuläre Injektion des Antigens zu bestimmen. Die AIA entwickelt sich spontan in eine chronische Entzündung, wobei eine Unterscheidung in eine akute (0-7 Tage p.i.) und eine chronische Phase (ab 7. Tag p.i.) möglich ist (Schurigt et al. 2005). Bereits 3 Tage nach Induktion der Arthritis sind histologische Zeichen einer beginnenden chronischen Entzündung erkennbar (Bär et al. 2004). Das Antigen mBSA ist bis zum Auftreten chronischer Symptome im Gelenk nachweisbar, was als einer der wesentlichen Mechanismen der Chronifizierung angesehen wird (van den Berg et al. 1982, 1984). Tiere mit einer Antigen-induzierten Arthritis entwickeln aufgrund der entstandenen Hyperalgesie und Allodynie ein deutlich schmerzhaftes Verhalten auf Reizung der entzündeten Extremität, welches je nach Länge des Betrachtungszeitraums für mindestens 3-4 Wochen anhält (Segond

von Banchet et al. 2000, Bär et al. 2004, Böttger et al. 2008). Wie bei der Rheumatoiden Arthritis beim Menschen sind also mechanische Hyperalgesie, Allodynie und persistierende Schmerzen die führenden Symptome, weshalb die Antigen-induzierte Arthritis wiederum ein passendes Modell zur Untersuchung der Mechanismen arthritischer Schmerzen zu sein scheint (Segond von Banchet et al. 2000). Wichtige Unterschiede zwischen tierexperimentell ausgelöster RA und humaner RA beinhalten den viel schnelleren Progress der experimentell induzierten Arthritis sowie die Tendenz zur umschriebenen Knochenresorption und -formation bei Nagern im Vergleich zum Menschen (Bendele 2001). Die endgültige Wahl des Tiermodells gestaltet sich dabei wesentlich abhängig vom Zweck der Studie. Im Fall der Charakterisierung spinaler nozizeptiver Signaltransduktionsketten erscheinen Modelle, die zu einer Polyarthrititis führen eher nachteilig. Bei einer Polyarthrititis handelt es sich um eine multifokale Erkrankung mit ausgeprägten systemischen Veränderungen bezüglich Verhalten, Physiologie und Biochemie wodurch der Einfluss auf Neurone viel dramatischer ausfallen könnte (Pearson 1963, Butler et al. 1992, Grubb et al. 1993, Schaible & Grubb 1993, Danziger et al. 1999). Es ergibt sich also bedingt ein Kausalitätsproblem, welches vermieden werden kann, indem man zum Beispiel auf das Modell der Antigen-induzierte Arthritis zurückgreift. Hierbei wird eine lokalisierte Monoarthrititis induziert, wobei die neuronalen Prozesse im direkten Zusammenhang mit dem Entzündungsprozess stehen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Arbeitsgruppe um Meyer zu einem weit fortgeschrittenen Zeitpunkt einer AIA bei Ratten (80 Tage nach Induktion) ebenfalls den gleichzeitigen Befalls des kontralateralen Kniegelenkes zeigten, wobei die anderen Gelenke unbeeinträchtigt blieben (Meyer et al. 2000). Den Einbezug des kontralateralen Gelenkes nach induzierter Monoarthrititis wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Kidd et al. 1995). Das impliziert zum einen den Einfluss zentraler Verarbeitungsprozesse auf die kontralaterale Seite (neurogene Entzündung) (Mapp et al. 1993, Kidd et al. 1995) und zieht zum anderen die zusätzliche Klassifizierung der AIA als Modell einer Oligoarthrititis nach sich (Meyer et al. 2000). Histologisch betrachtet ist die AIA auf 1 Gelenk beschränkt und bedingt eine nur geringfügig ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion, weshalb der Einfluss auf die neuronale Exzitabilität bei weitem geringer auszufallen scheint als im Rahmen von Entzündungsmodellen, die eine Polyarthrititis zur Folge haben.

#### **6.4 Bewertung der Arthritis anhand Gelenkumfang, Verhalten und Histologie**

Wenn auch nicht systematisch mittels Verhaltensexperimenten examiniert, zeigten die hier untersuchten Tiere mit einer akuten Arthritis (Tag 1 und 3) zum einen ein im Vergleich zu

chronischen Entzündungsphasen deutlich geschwollenes Kniegelenk sowie alle Anzeichen eines verstärkten Schmerzerlebens im Sinne einer gesteigerten Empfindlichkeit auf nicht schmerzhaftes und schmerzhaftes Pressen des entzündeten Kniegelenkes sowie im Allgemeinen ein schmerzvermeidendes Verhalten wie Entlastung des entzündeten Gelenkes bzw. Humpeln und Hinterherziehen der Extremität. Dahingegen waren die Kniegelenksumfänge am Tag 21 nach Arthritisinduktion deutlich geringer und die Tiere zeigten ebenso ein reduziertes Schmerzverhalten.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Arbeitsgruppen. So konnte ein Maximum der Kniegelenksumfänge am 1. und 3. Tag nach Arthritisinduktion mit einem anschließend graduellen Absinken der Werte im Verlauf der Arthritis verzeichnet werden (Meyer et al. 2000, Segond von Banchet et al. 2000, Schurigt et al. 2005, Böttger et al. 2008). Ebenso kommt es am Tag 1-3 nach AIA-Induktion zu einer maximal verstärkten mechanischen Hyperalgesie, sekundären Hyperalgesie sowie verstärktem Schmerzverhalten im Sinne eines Vermeidungsverhaltens wie Nichtbelasten des Beines gefolgt von einem Rückgang jener Symptome im weiteren Verlauf der Arthritis (Tag 7, 14 und 21) (Böttger et al. 2008). Segond von Banchet et al. beobachteten ebenfalls eine verstärkte mechanische Hyperalgesie sowie Gangabnormalitäten zwischen dem 1.-9. Tag nach Arthritisinduktion. Ab dem 9.-21. Tag zeigte sich ein weniger stark ausgeprägtes entzündungsassoziiertes Verhalten, gefolgt von der Normalisierung des Ganges ab dem 37. Tag (Segond von Banchet et al. 2000). In Bezug auf das nozizeptive Verhalten ist also einerseits davon auszugehen, dass die Tiere je nach Arthritisstadium Schmerzen in unterschiedlicher Intensität empfanden und dass im Umkehrschluss die induzierte Arthritis einem Wandel von einer akuten zur chronischen Phase unterlag. Zusätzlich kann aufgrund der erhobenen Kniegelenksumfänge ein solcher Wechsel angenommen werden.

Zur stichprobenartigen Validierung dieser Annahme wurden außerdem histologische Präparate angefertigt. Fibrinexudation sowie granulozytäre Infiltration der Synovia und des Gelenkspaltes als Zeichen der akuten Entzündung waren ebenso wie die nun verstärkt mononukleäre Infiltration mit Pannusformation und Erosion von Knorpel und Knochen sichtbar, was in vorherigen Studien intensiv untersucht wurde (Segond von Banchet et al. 2000, Böttger et al. 2008).

Der Übergang der Arthritis von der akuten zur chronischen Phase konnte somit anhand des Verhaltens, der Kniegelenksumfänge und stichprobenartig anhand histologischer Untersuchungen angenommen werden.

### **6.5 Einfluss von EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten auf Hinterhornneurone im Verlauf einer Arthritis**

Studien die entweder mit gentechnisch veränderten Tieren, denen jeweils einer der PG-Rezeptoren fehlt, durchgeführt wurden oder solche bei denen synthetische hergestellte PG-Rezeptor-Liganden zum Einsatz kamen, konnten bisher noch kein kohärentes Bild der PG-Rezeptoren erstellen, die für die entzündungsassoziierte Schmerzsensibilisierung verantwortlich sind (Reinold et al. 2005). Zudem beschäftigten sich bisher nur wenige Arbeitsgruppen mit der Bedeutung spinaler Prostaglandine im Verlauf einer Entzündung. Unter normalen Bedingungen können sowohl EP<sub>1</sub>- als auch EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten einen Zustand der spinalen Hyperexzitabilität induzieren, wie er durch topisch appliziertes PGE<sub>2</sub> hervorgerufen wird (Bär et al. 2004). Jedoch bewirkte während einer etablierten akuten Entzündung (7-11 h nach K/C-Injektion ins Kniegelenk) nur noch der EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist eine signifikante Steigerung der neuronalen Entladungen während die EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten diesbezüglich wirkungslos blieben (Bär et al. 2004).

In unseren Experimenten kam es am Tag 3 nach Arthritisinduktion unter den EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten zu einem tendenziellen Abfall der Antworten auf innoxische und noxische Stimulation des entzündeten Kniegelenkes während die Stimulation des nicht entzündeten Sprunggelenkes und der Pfote zu einer tendenziellen Steigerung der Antworten führte. Dahingegen konnte unter chronischen Entzündungsbedingungen keinerlei Einfluss auf die Entladungsraten der abgeleiteten Neurone festgestellt werden. Methodisch betrachtet ist es eher unwahrscheinlich, dass eine zu niedrige Konzentration der verwendeten Agonisten für deren Wirkungslosigkeit verantwortlich war, da sie in der gleichen Konzentration (100 ng/μl) verwendet wurden, wie bei den Experimenten von Bär et al., wo ein Einfluss dieser Substanzen auf die neuronale Signaltransduktion in aufsteigender Konzentration (0,1-100 ng/μl) bereits ab einer Konzentration von 1 ng/μl signifikant ersichtlich war (Bär et al. 2004). Allerdings ist eine genaue Angabe zur erreichten Gewebekonzentration im tiefen Hinterhorn nicht möglich. Eine mögliche Abnahme der Konzentration mit zunehmender Gewebetiefe muss trotzdem angenommen werden. Zudem kann eine denkbare Unwirksamkeit aufgrund von Präzipitation der Substanzen im Lösungsmittel bzw. in Verbindung mit Liquor im Rückenmarkspool weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Substanzen sehr gut im Substanzlösungsmittel Tyrode auflösbar und makroskopisch sowie mikroskopisch keine Verklumpung sichtbar war.

### 6.5.1 Effekt des EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-DI-004

Dass der EP<sub>1</sub>-Rezeptor Agonist ONO-DI-004 zum Zeitpunkt einer fortgeschrittenen akuten Arthritis (Tag 3) zum einen leicht hemmenden (Kniestimulation) und zum anderen leicht verstärkenden Effekt (Stimulation an Sprunggelenk und Pfote) auf die neuronale Übertragung hatte, verwundert angesichts der Ergebnisse von Bär et al., in denen eine progressive Steigerung der Antworten auf mechanische Reizung von Knie- und Sprunggelenk mittels des EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten während einer bereits etablierten Arthritis (7-11 h nach Induktion) erzielt werden konnte (Bär et al. 2004). Zudem demonstrierten andere Arbeiten anhand i.th. verabreichter EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten eine Beteiligung dieses Rezeptors an Carrageenan (Nakayama et al. 2002) und Formalin-induzierter zentraler Sensibilisierung (Malmberg et al. 1994). Ebenso beschrieben Minami et al. eine Beteiligung des EP<sub>1</sub>-Rezeptors an PGE<sub>2</sub>-induzierter Allodynie (Minami et al. 1994a). In Verhaltensstudien mit EP<sub>1</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen zeigten diese keine Reaktion auf intrathekales PGE<sub>2</sub> (Minami et al. 2001) sowie eine um 50% gesenkte Schmerzsensibilität in der Abwehrreaktion auf i.p. injizierte Essigsäure (Stock et al. 2000), wodurch eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Entstehung von PGE<sub>2</sub>- bzw. entzündungsbedingter Hyperalgesie vermutet werden kann.

Die Ursachen für diese abweichenden Ergebnisse sind vielfältiger Natur. Im Vergleich zu den Arbeiten von Bär et al. bestand die akute Arthritis zum Zeitpunkt unserer Ableitung generell deutlich länger als bei dieser Arbeitsgruppe, die den Einfluss der verschiedenen PG-Rezeptor-Agonisten ungefähr 7-11 h nach Induktion der Arthritis untersuchten und den Einfluss dieser Substanzen im weiteren Verlauf der Entzündung nicht weiter testeten. Unsere Ableitungen bei der akuten Arthritis erfolgten 3 Tage nach Entzündungsinduktion. Somit sind mögliche Veränderungen der Enzymausstattung, Rezeptorexpression und Sensibilität oder Wirkstoffkonzentration im COX-Prostaglandin-System innerhalb dieses Zeitraumes nicht erfasst worden. Es wäre denkbar, dass es zu einer Reduktion der Prostaglandinsynthese bzw. zu einer Desensibilisierung oder Herunterregulierung der Prostaglandinrezeptoren mit Fortschreiten der Entzündung kommt, wodurch ebenso der Wirkungsverlust von topisch applizierten NSAIDs unter etablierten Entzündungsbedingungen erklärt werden könnte. In der Tat sind die Werte der spinalen COX-2 mRNA 24 h nach CFA-induzierter Entzündung zwar noch erhöht, jedoch nicht mehr signifikant im Vergleich zu den Ausgangswerten (Hay et al. 1997). Damit einhergehend stellte sich nach dem anfänglichen Höhepunkt der spinalen PGE<sub>2</sub>-Freisetzung 6 (Reinold et al. 2005), 8 (Hay et al. 1997) oder 12 h (Samad et al. 2001) nach Zymosan oder CFA-induzierter Entzündung ebenso ein tendenzieller Abfall der PGE<sub>2</sub>-Konzentration 24 h nach Beginn der Entzündungsinduktion ein, obwohl die Werte jedoch im

Vergleich zu unbehandelten Tieren immer noch signifikant erhöht waren (Hay et al. 1997, Dirig & Yaksh 1999, Samad et al. 2001). Interessanterweise war 24 h nach CFA-induzierter Entzündung bzw. nach der 24-stündigen Inkubation mit PGE<sub>2</sub> eine verminderte Bindung von PGE<sub>2</sub> im Rückenmark sowie in DRG-Neuronen sichtbar, was gleichbedeutend mit einer Herunterregulierung von PG-Rezeptoren ist (Southall et al. 2002). Inwiefern es zu einer Modifikation der Expression jedes einzelnen PG-Rezeptors in DRG-Neuronen sowie im Rückenmark kommt, untersuchten Donaldson et al. 2001. Für die Expression des EP<sub>1</sub>-Rezeptors konnten sie sowohl 1 Tag als auch 3 Tage nach CFA-induzierter Sprunggelenkentzündung keine signifikante Modulation des Expressionsmusters feststellen, weder in DRG-Neuronen noch im Rückenmark (Donaldson et al. 2001). Die beobachtete Verminderung PGE<sub>2</sub>-bindender Elemente (Southall et al. 2002) muss demnach also durch die Regulation anderer PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren verursacht worden sein. Dass Donaldson et al. keine bedeutende Modulation des EP<sub>1</sub>-Rezeptors am Tag 1 und 3 nach Entzündungsinduktion feststellten, kann ein Hinweis darauf sein, dass der Aufrechterhaltung der spinalen Übererregbarkeit im weiteren Verlauf einer Entzündung über die Aktivierung des EP<sub>1</sub>-Rezeptors keine weitere Bedeutung zugeschrieben werden kann.

Daten, die mittels EP<sub>1</sub>-Rezeptor defizienten Tieren ermittelt wurden, müssen mit Vorsicht interpretiert werden. Obwohl Stock et al. eine um 50% gesenkte Schmerzsensibilität in der Abwehrreaktion auf i.p. injizierte Essigsäure feststellten (Stock et al. 2000), konnte in einer anderen Studie ebenfalls mit *ep<sub>1</sub><sup>-/-</sup>*-Mäusen kein Unterschied im gleichen Testverfahren ermittelt werden (Ueno et al. 2001). Ein Vergleich mit unseren Daten erscheint aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns eher schwierig, da keine Unterscheidung zwischen der Beteiligung von peripheren und zentralen Rezeptoren bei knock-out Tieren erfolgen kann. Zudem sind Studien mit gentechnisch veränderten Tieren besonders anfällig für eine Reihe von Problemen, wie der genetische Hintergrund der Tiere, die Funktionen des ausgefallenen Genes während der Entwicklung oder kompensatorische Veränderungen durch die Deletion (Woolf et al. 1998).

Was die Ergebnisse während chronischer Entzündungsstadien betrifft, liegen keine Studien zur Rezeptorexpression bzw. Prostaglandingehalt vor, wodurch ein Vergleich zu unseren Daten möglich wäre. Ob der EP<sub>1</sub>-Rezeptor in seinem Expressionsverhalten einer signifikanten Modulation unterliegt, müssen weitere Experimente klären. Die PGE<sub>2</sub>-Freisetzung im Rückenmark steigt zwar unter chronischen Entzündungsbedingungen wieder an (Hay et al. 1997), ebenso wie die COX-2 (Beiche et al. 1998a), doch scheint anhand unserer Ergebnisse keine Modulation der spinalen Erregbarkeit über den EP<sub>1</sub>-Rezeptor stattzufinden.

Ein anderer wichtiger Aspekt, der die unterschiedlichen Aussagen zur Beteiligung des EP<sub>1</sub>-Rezeptors an entzündungs- oder PGE<sub>2</sub>-assoziierter Hyperexzitabilität näher beleuchtet, sind mögliche Unterschiede bezüglich des Verlaufes der Enzyminduktion, PGE<sub>2</sub>-Konzentration sowie Rezeptorexpression und -modulation innerhalb der verschiedenen Entzündungsmodelle. Unsere Arbeitsgruppe verwendete das Modell der Antigen-induzierten Arthritis, die Gruppe um Bär und Nakayama das der Kaolin-Carrageenan-induzierten Arthritis bzw. Entzündung und Malmberg et al. benutzten den Formalin-Test. Dabei scheinen die verschiedenen Entzündungsmodelle einem unterschiedlichen Zeitverlauf des Auftretens nozizeptiver Inputs und Outputs zu unterliegen (Honoré et al. 1999), wodurch ein Vergleich von Daten zwischen den Entzündungsmodellen teilweise schwierig ist. Dass der Beitrag verschiedener Prostaglandine und Prostaglandinrezeptoren zur Genese entzündungsbedingter Schmerzen entscheidend von der Art des Schmerzes abzuhängen scheint und dass deshalb eine systematische Evaluierung der unterschiedlichen Phänotypen des Schmerzes unabdingbar sind, beschreiben ebenso eindrücklich Zeilhofer & Brune (Zeilhofer & Brune 2006). Abweichungen in der Aktivität des COX-PG-Systems zwischen den einzelnen Entzündungsmodellen sind deshalb nicht auszuschließen und könnten die Unwirksamkeit des EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten bei unserem Versuchsmodell möglicherweise erklären, verdeutlichen jedoch auch, dass die Aufschlüsselung der Pathomechanismen jedes einzelnen Modells notwendig erscheint.

Bezüglich der auf Kniestimulation beobachteten hemmenden sowie auf Sprunggelenks- und Pfotenstimulation beobachteten verstärkenden Wirkung des EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten, lässt sich folgendes anmerken. Aufgrund der geringen Fallzahl lässt sich für diese Beobachtung keine Signifikanz berechnen, d.h., inwieweit dieser Effekt einer tatsächlichen Wirkung entspricht oder aber nur zufällige Beobachtung ist, bleibt unklar. Für eine statistisch sichere Aussage wäre eine höhere Fallzahl von Nöten. Zudem waren die Änderungen der Entladungsraten insgesamt eher gering und somit erfahrungsgemäß eher vernachlässigbar, weshalb man eher von einer Wirkungslosigkeit des EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten ausgehen muss.

### **6.5.2 Effekt des EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten Butaprost**

In unseren Experimenten beobachteten wir eine leicht fallende Aktionspotentialanzahl auf nicht schmerzhaft und schmerzhaft Kniestimulation und eine tendenziell ansteigende Zahl auf Sprunggelenks- und Pfotenstimulation am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Unter chronischen Entzündungsbedingungen (Tag 21) war keine wesentliche Änderung des Antwortverhaltens der Hinterhornneurone ersichtlich.

Dass bei der Entstehung spinaler Hyperalgesie der EP<sub>2</sub>-Rezeptor eine Rolle zu spielen scheint, belegen einige Arbeiten. Baba et al. zeigten eine durch PGE<sub>2</sub>-vermittelte Depolarisation von Hinterhornneuronen durch die Öffnung von unselektiven Kaliumkanälen. Gleichsam konnte der EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist Butaprost einen Einwärtsstrom imitieren, wie er durch PGE<sub>2</sub> erzeugt wird, wodurch die Wirkung von PGE<sub>2</sub> an Hinterhornneuronen EP<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt erscheint (Baba et al. 2001). Ebenso führt bei gesunden Tieren die spinale Zugabe von Butaprost zur Entwicklung spinaler Hyperexzitabilität, wie sie bei der spinalen Applikation von PGE<sub>2</sub> oder einer peripheren Entzündung beobachtet wird (Bär et al. 2004). Analog bewirkt in Verhaltensstudien i.th. verabreichtes Butaprost eine deutliche Hyperalgesie (Minami et al. 1994a). Und im Gegensatz entwickeln EP<sub>2</sub>-Rezeptor defekte Mäuse keine thermische und mechanische Hyperalgesie auf i. th. verabreichtes PGE<sub>2</sub> (Reinold et al. 2005). Auch im Formalin-Test zeigten *ep<sub>2</sub><sup>-/-</sup>*-defiziente Mäuse ein reduziertes nozizeptives Verhalten zu Beginn der induzierten Entzündung (Hösl et al. 2006). All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass PGE<sub>2</sub> seine Wirkung über die Bindung an EP<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt und für die Entstehung von zentraler Hyperalgesie bedeutsam ist.

Zum Zeitpunkt einer etablierten akuten Arthritis (7-11 h nach Arthritisinduktion durch K/C) ändert sich das Bild. Hier bewirkt die spinale Zugabe von Butaprost keinen zusätzlich verstärkenden Effekt auf die Erregbarkeit von Hinterhornneuronen auf nicht noxische und noxische Stimulation von Knie- und Sprunggelenk (Bär et al. 2004).

In unseren Ergebnissen konnte dies zwar nicht betätigt aber auch nicht ausgeschlossen werden. Generell muss allerdings bemerkt werden, dass unsere Untersuchungen im Vergleich zu denen von Bär et al. deutlich später, nämlich 3 Tage nach Arthritisinduktion, stattfanden. Wir beobachteten, dass es zu einem tendenziellen Abfall der Entladungen auf nicht noxische und noxische Kniegelenksreizung kam, während die Stimulation an Sprunggelenk und Pfote eine tendenzielle Steigerung des Entladungsverhaltens spinaler Hinterhornneurone unter Zusatz des EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten bewirkte. Wie bereits für den EP<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten erwähnt, lässt sich auch hier keine Aussage bezüglich einer Signifikanz oder Zufall aufgrund der zu geringen Fallzahl treffen und jegliche Wertungen wären spekulativ. Betrachtet man sich jedoch das Expressionsverhalten des EP<sub>2</sub>-Rezeptors, so zeigt sich im Rückenmark sowie in DRG-Neuronen durch eine CFA-induzierte Sprunggelenksentzündung keine Modifikation der EP<sub>2</sub>-Rezeptor Expression am Tag 1 und 3 nach Entzündungsinduktion (Donaldson et al. 2001). Diese Daten deuten darauf hin, dass der EP<sub>2</sub>-Rezeptor, wie der EP<sub>1</sub>-Rezeptor, zumindest während etablierter akuter (Tag 1) sowie fortgeschrittener akuter Entzündungsstadien (Tag 3), keiner weiteren Regulation zu unterliegen scheint. Im



Umkehrschluss bedeutet dies, dass er bei der Entstehung spinaler Hyperexzitabilität eine Rolle zu spielen scheint, nicht aber für den weiteren Fortgang dieser. In kultivierten CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) wurde außerdem eine mögliche Desensibilisierung des EP<sub>2</sub>-Rezeptors auf prolongierten Zusatz von PGE<sub>2</sub> getestet. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass der EP<sub>2</sub>-Rezeptor mit zunehmender Metabolisierung von PGE<sub>2</sub> seine Suszeptibilität auf den Agonisten verliert (Nishigaki et al. 1996).

Dahingegen schreiben Reinhold anhand von Experimenten mit *ep<sub>2</sub><sup>-/-</sup>*-defekten Mäusen dem EP<sub>2</sub>-Rezeptor einen entscheidenden Einfluss nicht nur auf die Entstehung, sondern auch auf die Aufrechterhaltung entzündungsassoziierter Hyperalgesie zu. Wie bereits erwähnt, konnte i.th. verabreichtes PGE<sub>2</sub> bei *ep<sub>2</sub><sup>-/-</sup>*-Mäusen keine thermale und mechanische Hyperalgesie hervorrufen. Zum anderen zeigte sich ab der 4.- 6. Stunde nach Zymosan-induzierter Entzündung der Pfote eine signifikant reduzierte Hyperalgesie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Da ab dem 3.-4. Tag kein statistisch signifikanter Unterschied der Hyperalgesie im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Lösungsmittelinjektion mehr auszumachen war, wird dem EP<sub>2</sub>-Rezeptor in diesem Untersuchungsmodell ebenso eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Hyperalgesie zugeschrieben (Reinold et al. 2005).

Welche Bedeutung dem EP<sub>2</sub>-Rezeptor nun unter chronischen Entzündungsbedingungen zugesprochen werden kann, bleibt aufgrund mangelnder Untersuchungen Gegenstand weiterer Analysen. Unsere Ergebnisse lassen keine weitere Beteiligung an der Aufrechterhaltung spinaler Übererregtheit für wahrscheinlich erscheinen. Weder unter nicht noxischer als auch noxischer Stimulation von Knie-, Sprunggelenk und Pfote kam es zu einer signifikanten Änderung des Entladungsverhaltens der abgeleiteten Neurone. Bezüglich der Ergebnisse von Reinold et al., die eine Beteiligung des EP<sub>2</sub>-Rezeptors bei der Aufrechterhaltung spinaler Hyperexzitabilität postulierten, wäre eine Beobachtung über den Zeitraum von 4 Tagen hinaus wünschenswert gewesen.

Diese Ausführungen verdeutlichen folgende Aspekte: Anhand von knock-out Tieren lässt sich zwar ein entsprechender Schmerzphänotyp ermitteln, doch erfolgt keine Trennung zwischen dem Ausfall peripherer und zentraler PG-Rezeptoren. Zudem sind die Arbeiten hierzu großteils Verhaltensstudien, wodurch keine isolierte Betrachtung spinaler Prozesse stattfindet und ein direkter Vergleich mit unseren Daten aufgrund dessen schwierig ist. Wie bereits erwähnt scheinen auch verschiedene PG-Rezeptoren bzw. Mechanismen zur zentralen Sensibilisierung innerhalb der einzelnen Entzündungsmodelle eine Rolle zu spielen (Hösl et al. 2006). Entsprechende Experimente mit Prostaglandinrezeptorantagonisten während akuter und chronischer Entzündungsstadien wären besonders wünschenswert, um die Bedeutung der

einzelnen Prostaglandinrezeptoren genauer zu erforschen. Allerdings scheitert dies bisher an der Verfügbarkeit dieser. Ob es ferner bei knock-out Tieren durch den ausgefallenen EP<sub>2</sub>-Rezeptor zu einer kompensatorischen Hochregulierung der Expression anderer Prostaglandinrezeptoren kommt, ist ebenso unklar. Solch ein kompensatorisches Phänomen ist bisher nur für COX-2 defekte Tiere beschrieben worden, bei denen eine verstärkte Expression der spinalen COX-1 nach Deletion der COX-2 festgestellt wurde (Ballou et al. 2000).

### **6.5.3 Effekt des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE1-329**

In unseren Experimenten beobachteten wir, wie bei den EP<sub>1</sub>- und EP<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten, eine leicht fallende Aktionspotentialanzahl auf nicht schmerzhafte und schmerzhafte Kniestimulation und eine tendenziell ansteigende Anzahl auf Sprunggelenks- und Pfotenstimulation am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Unter chronischen Entzündungsbedingungen (Tag 21) war keine wesentliche Änderung des Antwortverhaltens der Hinterhornneurone ersichtlich.

In der Literatur finden sich nur wenige Angaben zum Einfluss von EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten auf die spinale Signaltransduktion. Wie bei den EP<sub>1</sub>- und EP<sub>2</sub>-Rezeptoren erfolgt über den EP<sub>4</sub>-Rezeptor unter nativen Bedingungen eine dosisabhängige Steigerung spinaler Antworten auf eine kontrollierte Knie- und Sprunggelenksreizung, wodurch eine Bedeutung bei der Entstehung spinaler Hyperexzitabilität impliziert wird (Bär et al. 2004). Bei jedoch etablierter akuter Entzündung (7-11h nach Arthritisinduktion) führte die spinale Applikation des EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten zu keiner weiteren Beeinflussung der Aktivität der abgeleiteten Hinterhornneurone (Bär et al. 2004). Somit schlussfolgerten Bär et al., dass die Aktivierung des EP<sub>4</sub>-Rezeptors den Status der Hyperexzitabilität nicht weiter unterhält (Bär et al. 2004).

Den beobachteten Wirkverlust bei Bär et al. möglicherweise erklärend sind die Ergebnisse von Nishigaki et al., die eine Herunterregulierung der EP<sub>4</sub>-Rezeptoren in CHO-Zellen auf den verlängerten Zusatz von PGE<sub>2</sub> feststellten und zusätzlich eine kurzzeitige, Agonisten-induzierte Desensibilisierung des Rezeptors entdeckten (Nishigaki et al. 1996). Eine Desensibilisierung des Rezeptors für den Agonisten wäre also durchaus als Erklärung denkbar. Tatsächlich erfährt der EP<sub>4</sub>-Rezeptor im Rückenmark am Tag 1 nach CFA-induzierter Sprunggelenkentzündung aber eine leichte und signifikante Zunahme der Expression (Donaldson et al. 2001), wodurch eine Steigerung der Antworten auf mechanische Reizung zu erwarten gewesen wäre. Interessanterweise lässt sich zur gleichen Zeit auf präsynaptischer Seite ein signifikanter Abfall der EP<sub>4</sub>-Rezeptor mRNA Expression in DRG-

Neuronen feststellen (Donaldson et al. 2001), was den Wirkverlust von ONO-AE1-239 unter akuten Entzündungsbedingungen teilweise erklären könnte. Unter Umständen summieren sich der Abfall der EP<sub>4</sub>-Rezeptoren-Dichte auf präsynaptischer (DRG-Neurone) und die Zunahme auf postsynaptischer Seite (Hinterhorn) derart, dass sich im Endeffekt keine gravierende Beeinflussung der zentralen Übererregbarkeit unter etablierten akuten Entzündungsbedingungen via EP<sub>4</sub>-Rezeptor einstellt.

3 Tage nach CFA-induzierter Sprunggelenksentzündung konnte keine weitere Modulation der EP<sub>4</sub>-Rezeptor mRNA Expression sowohl in DRG-Neuronen als auch Rückenmark gemessen werden (Donaldson et al. 2001). Daraus ließe sich schließen, dass unter etablierten akuten Entzündungsbedingungen dem EP<sub>4</sub>-Rezeptor keine weitere Bedeutung zugesprochen werden kann. Da sich aber für unsere Ergebnisse keine Signifikanz bestimmen ließ, können diese Ergebnisse auch nicht miteinander kausal verknüpft werden.

Für chronische Entzündungsbedingungen liegen in der Literatur keine vergleichbaren Studien vor, weshalb unsere Ergebnisse isoliert betrachtet werden müssen. Hier lässt sich postulieren, dass der EP<sub>4</sub>-Rezeptor seine Rolle im Verlauf einer Entzündung zu verändern scheint und die Aufrechterhaltung der spinalen Hyperexzitabilität über die Aktivierung dieses Rezeptors nicht weiter angenommen werden kann.

Mangels zusätzlicher Studien bezüglich Rezeptorexpression und Wirkweise von Rezeptoragonisten und -antagonisten zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Entzündung und ggf. auch Studien mit knock-out Tieren sind vergleichende Aussagen nicht weiter möglich.

## **6.6 Einfluss des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 und des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240 auf Hinterhornneurone im Verlauf einer Arthritis**

In unseren Experimenten bewirkte die spinale Applikation des EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 am Tag 3 nach Arthritisinduktion keinerlei Beeinflussung des Entladungsverhaltens der abgeleiteten Hinterhornneurone. Demgegenüber kam es unter chronischen Entzündungsbedingungen (Tag 21) zu einer signifikanten Absenkung der Impulse bereits ab einer Konzentration von 1 ng/μl der Testsubstanz.

Innerhalb des EP<sub>3</sub>-Rezeptors gibt es verschiedene Splicevarianten, die an G<sub>i</sub>-, G<sub>s</sub>-, G<sub>q</sub>- oder G<sub>o</sub>-Proteine gebunden sind und somit einen Abfall bzw. Anstieg in der cAMP- oder Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bewirken (Negishi et al. 1995). ONO-AE-248 ist ein Agonist für die EP<sub>3</sub>-Splicevariante und verursacht durch die Bindung an ein inhibitorisches G-Protein einen Abfall im intrazellulären cAMP-Gehalt (Zacharowski et al. 1999). In den Experimenten von Bär et al. zeigte sich zum Zeitpunkt einer etablierten akuten Arthritis (7-11 h nach K/C-

induzierter Arthritis) ein signifikanter Abfall der neuronalen Antworten auf noxische und innoxische Reizung des entzündeten Knies durch die spinale Applikation von ONO-AE-248. Ebenso kam es zu einer Reduktion und teilweise komplettem Verschwinden bestehender Spontanaktivität (Bär et al. 2004). Diese inhibitorische Wirkung war außerdem auf PGE<sub>2</sub>-vermittelte Effekte am Rückenmark sowie in patch-clamp Ableitungen von DRG-Neuronen sichtbar, wo der EP<sub>3</sub>-Agonist die durch PGE<sub>2</sub> verstärkten Antworten spinaler Hinterhornneurone auf mechanische Stimulation des normalen, nicht entzündeten Kniegelenkes reduzierte sowie PGE<sub>2</sub>-sensibilisierte Na<sup>+</sup>-Ströme in DRG-Neuronen dosisabhängig verminderte (Bär et al. 2004). Dabei zeigte dieser Agonist unter normalen Bedingungen keinen signifikanten Wirkeffekt auf das Entladungsverhalten spinaler Neurone (Bär et al. 2004), was entzündungsassoziierte Veränderungen der Aktivität dieses EP-Rezeptors impliziert.

Der EP<sub>3</sub>-Agonist ONO-AE-248 ist also über die Reduktion der cAMP-Konzentration fähig, die neuronalen Antworten, die entweder unter normalen Bedingungen durch PGE<sub>2</sub> oder durch eine akute Entzündung mit resultierender PGE<sub>2</sub>-Freisetzung initiiert wurden, dosisabhängig und wirkungsvoll zu vermindern und somit der sensibilisierenden Aktion vom PGE<sub>2</sub> auf die spinale Nozizeption entgegen zu wirken. Generell scheinen erhöhte cAMP-Level und die Aktivität der Proteinkinasen A und C in Prozessen der Nozizeption und Hyperexzitabilität eingebunden zu sein (Cerne et al. 1992, England et al. 1996, Malmberg et al. 1997, Sluka & Willis 1997, Kawasaki et al. 2004). Und in der Tat scheint die Beeinflussung des cAMP-Spiegels von Bedeutung zu sein, da Veränderungen der neuronalen Aktivität während einer Entzündung v.a. durch Agonisten solcher Rezeptoren verursacht wurden, die an den cAMP-Weg gekoppelt sind, d.h. an EP<sub>2</sub>-, EP<sub>3</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptoren (Negishi et al. 1995, Narumiya et al. 1999). Die Modulation des cAMP-Spiegels mittels entsprechender Prostaglandinrezeptoragonisten bzw. -antagonisten, im Speziellen mit einem EP<sub>3</sub>-Agonisten, könnte somit in der Zukunft im klinischen Gebrauch eine Möglichkeit zur Beeinflussung der spinalen Nozizeption darstellen.

Diesen Ausführungen sind allerdings die Ergebnisse einiger anderer Arbeiten gegenüberzustellen. In Verhaltensstudien von Minami et al. zur Aufklärung der an Hyperalgesie und Allodynie involvierten PG-Rezeptoren postulierten diese, dass die Aktivierung von EP<sub>3</sub>-Rezeptoren zur PGE<sub>2</sub>-vermittelten Hyperalgesie beiträgt (Minami et al. 1994a). Ebenso Nishihara et al. berichten über eine Einbeziehung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors an der PGE<sub>2</sub> initiierten Hyperalgesie (Nishihara et al. 1995). Interessanterweise war der EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE-248 in einer Studie mit knock-out Mäusen in der Lage, einen

hyperalgetischen Effekt bei  $ep_3^{+/+}$ -Mäusen zu produzieren, jedoch nicht bei  $ep_3^{-/-}$ -Mäusen, was wiederum die Beteiligung dieses Rezeptors an der Entstehung PGE<sub>2</sub>-vermittelter Hyperalgesie zu bestätigen scheint (Minami et al. 2001). Zudem zeigte sich in den Verhaltensstudien von Ueno et al. eine signifikant erniedrigte Abwehrreaktion auf i.p. applizierte Essigsäure bei EP<sub>3</sub>-Rezeptor defekten Mäusen, wenn sie vorher mit LPS i.p. vorbehandelt wurden (Ueno et al. 2001). Des Weiteren scheint die Aktivierung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors an der PE<sub>2</sub>-vermittelten und verstärkten Entladung von polymodalen Nozizeptoren durch Bradykinin beteiligt zu sein (Kumazawa et al. 1993, 1996).

Die Erklärungen für diese Diskrepanzen sind vielfältiger Natur. Bezüglich der Experimente von Minami et al. (1994a) sei anzumerken, dass aufgrund zu dieser Zeit noch fehlender spezifischer PG-Rezeptor-Agonisten solche verwendet wurden, die nicht reine, selektive EP<sub>3</sub>-Agonisten sind, sondern zusätzlich andere PG-Rezeptoren aktivieren. So kamen beispielsweise Sulprostone, 17-Phenyl- $\omega$ -trinor PGE<sub>2</sub>, 16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> oder MB 28767 zum Einsatz, die alle in unterschiedlicher Ausprägung neben der Aktivierung von EP<sub>3</sub>-Rezeptoren zusätzlich EP<sub>1</sub>- und teilweise EP<sub>2</sub>-Rezeptoren stimulieren (Minami et al. 1994a, Kiriya et al. 1997, Tsuboi et al. 2002). Somit lässt sich die beobachtete Hyperalgesie nach i.th. Zugabe dieser Substanzen nicht allein auf die Aktivierung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors beziehen und macht den verstärkenden Einfluss auf die nozizeptive Verarbeitung über die Aktivierung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors strittig. Erschwerend für die Interpretation dieser Arbeiten ist außerdem die Tatsache, dass keine Angaben zur genauen Selektivität der verwendeten EP<sub>3</sub>-Rezeptor Agonisten in den zitierten Arbeiten gemacht wurden, d.h. es bleibt unklar, welche der Splicevarianten des EP<sub>3</sub>-Rezeptors durch die Substanzen stimuliert wurde. In Anbetracht dessen, dass der EP<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonist ONO-AE-248 an ein inhibitorisches G-Protein bindet und eine Hemmung der nozizeptiven Verarbeitung erzielte, könnte vermutet werden, dass die bei Minami verwendeten EP<sub>3</sub>-Rezeptor Agonisten, die eine proalgetische Wirkung aufwiesen, an ein stimulierendes G-Protein koppelten und über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Entstehung der Hyperexzitabilität beitrugen. Unabhängig davon können zusätzlich Differenzen in der Rezeptordichte, Rezeptorsensibilität oder in der Effektivität der Rezeptor-Effektor-Bindung die Bindungspotenz der Agonisten dramatisch verändern (Minami et al. 1994a, Narumiya & FitzGerald 2001).

Hinsichtlich der Studien mit knock-out Tieren sollte die Interpretation der Ergebnisse Minamis et al. bzw. Uenos et al. unter 2 Aspekten kritisch erfolgen. Zum einen geht aus den Ausführungen nicht hervor, welcher Splicevariante des EP<sub>3</sub>-Rezeptors ausgeschaltet wurde (Minami et al. 2001, Ueno et al. 2001). Zum anderen sind beide Untersuchungen, wie auch

die Experimente Minamis et al. (1994a), Verhaltensstudien, d.h. hier werden komplexe neuronale Verschaltungen betrachtet. Somit ist es nicht möglich, zwischen dem Beitrag spinaler vs. peripherer EP<sub>3</sub>-Rezeptoren auf die zentrale Sensibilisierung zu differenzieren und diese Ergebnisse mit den Resultaten von extrazellulären Ableitungen spinaler Hinterhornneurone direkt zu vergleichen. Inwiefern spinale EP<sub>3</sub>-Rezeptoren und speziell welcher der Isoformen in die Entstehung spinaler Hyperexzitabilität eingebunden sind, bleibt also anhand dieser Experimente unklar. Zudem stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu denen Reynolds et al., der bei EP<sub>3</sub>-Rezeptor defekten Mäusen keinen Unterschied bei der PGE<sub>2</sub>-induzierten thermischen und mechanischen Hyperalgesie im Vergleich zu Wildtyp Mäusen fand, was den Beitrag anderer PG-Rezeptoren zur Entwicklung spinaler Hyperexzitabilität impliziert (Reinold et al. 2005). Studien mit gentechnisch veränderten Tieren sind, wie bereits erwähnt, besonders anfällig für eine Reihe von Problemen, wie der genetische Hintergrund der Tiere, die Funktionen des ausgefallenen Genes während der Entwicklung oder kompensatorische Veränderungen durch die Deletion (Woolf et al. 1998). Andere Einflussfaktoren, die bei der Interpretation jener Ergebnisse ebenfalls mit in Betracht gezogen werden müssen, sind zum einen die schon erwähnten Speziesunterschiede in der Rezeptorausstattung sowie Abweichungen in der Aktivität der verschiedenen Prostaglandine und deren Rezeptoren hinsichtlich des verwendeten Untersuchungsmodells. Hösl et al. verweisen beispielsweise auf Differenzen der zur zentralen Sensibilisierung beitragenden Mechanismen zwischen entzündungsassoziierten Schmerzen und neuropathischen Schmerzen (Hösl et al. 2006). Ebenso wird in einem Review von Zeilhofer & Brune darauf hingewiesen, dass die Beteiligung der verschiedenen Prostaglandine und Prostaglandinrezeptoren von der Art des Schmerzes, d.h. entzündlich oder neuropathisch, abzuhängen scheint und dass deshalb eine systematische Evaluierung der unterschiedlichen Phänotypen des Schmerzes unabdingbar sind (Zeilhofer & Brune 2006). Zudem existieren einige Kontroversen bezüglich der nozizeptiven Verarbeitung innerhalb einzelner entzündlicher Modelle. So zeigt sich beispielsweise kein Unterschied zwischen Wild-Typ Mäusen und EP<sub>3</sub>-Rezeptor defekten Mäusen im Formalin-induzierten Verhalten oder in der PGE<sub>2</sub>-induzierten Hyperalgesie während das Wegziehverhalten auf i.p. injizierte Essigsäure bei LPS vorbehandelten, *ep<sub>3</sub>*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich reduziert war (Minami et al. 2001, Ueno et al. 2001, Reinhold et al. 2005). Abweichungen in der Aktivität und Sensibilität der zahlreichen Rezeptor-Transmitter-Systeme im ZNS innerhalb der vielfältigen entzündlichen Modelle (Formalin-, CFA-, K/C-, Capsaicin-, LPS- oder Antigen-induzierte Entzündungen, u.a.) sind deshalb ebenso nicht auszuschließen. Zusätzlich muss auf Speziesunterschiede bezüglich Rezeptorexpression und -

gewebeverteilung sowie Ligandenaffinität und Prostaglandinaktivität hingewiesen werden (Kiriya et al. 1997, Narumiya et al. 1999), die ebenfalls als eine der Ursachen der beobachteten Unterschiede angesehen werden können.

Bei den o.g. Ausführungen wird lediglich der Zeitraum zu Beginn einer Entzündung bzw. bei einem etablierten akuten Entzündungsstatus betrachtet. Unsere Experimente wurden allerdings zu weiter fortgeschrittenen Zeitpunkten der AI-Arthritis (Tag 3 und 21) durchgeführt, worauf nun eingegangen werden soll. Zunächst müssen einige methodische Überlegungen angestellt werden. Zum einen muss ein möglicher Effekt des Substanzlösungsmittels Tyrode auf die neuronale Erregbarkeit bedacht werden. Nachdem sich eine Grundaktivität unter standardisierter Reizung von Knie-, Sprunggelenk und Pfote eingependelt hatte, blieben die Antworten der Hinterhornneurone stabil und es konnte problemlos die Baseline ermittelt werden. Eine Änderung der Entladungsrate war nicht ersichtlich, weshalb wir von keiner Beeinflussung der neuronalen Aktivität unter dem Substanzlösungsmittel ausgehen. Auch ließ sich ONO-AE-248 wie die übrigen EP-Rezeptor-Agonisten leicht lösen und es kam zu keiner Präzipitation der Substanz.

Wahrscheinlich scheint der Zeitpunkt einer Entzündung einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität des EP<sub>3</sub>-Rezeptors zu haben. Während ONO-AE-248 unter nativen Bedingungen keinen Effekt auf das Antwortverhalten spinaler Neurone zeigt, reduziert es dieses während einer etablierten akuten Arthritis (Bär et al. 2004). Vergleichende Aussagen zu den hier erzielten Ergebnissen am Tag 3 und 21 nach Entzündungsinduktion mit anderen Arbeiten sind jedoch nicht möglich, da sich nur einige Studien mit den langfristigen Veränderungen der spinalen Schmerzprozessierung beschäftigen und die dazu vorhandenen anderen Fragestellungen nachgehen bzw. im Studiendesign stark variieren. Aufgrund der generellen Wirkungslosigkeit von ONO-AE-248 am Tag 3 nach Entzündungsinduktion, muss von einer allgemeinen Desensibilisierung bzw. Herunterregulierung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors, ggf. sogar des gesamten COX-PG-Systems, zu diesem Zeitpunkt der Arthritis ausgegangen werden. Diese Hypothese wird von den Beobachtungen Beiche et al. gestützt, die bei CFA-induzierter Arthritis und peripher induzierter Entzündung durch Freundesches Adjuvans nach dem anfänglichen peak der spinalen COX-2 Expression einen Abfall am 3. Tag nach Entzündungsinduktion beobachteten mit darauf folgendem zweiten Anstieg über den beobachteten Zeitpunkt von 22 Tagen (Beiche et al. 1996, 1998a). Generell erscheint es möglich, dass das COX-PG-System in seiner Expression und Aktivität einer gewissen Autoregulation unterliegt bzw. über andere Transmittersysteme beeinflusst wird. Der 24-stündige Zusatz von PGE<sub>2</sub> zu kulturierten DRG-Neuronen bzw. eine periphere Entzündung

mit CFA bewirkten beispielsweise ein vermindertes Binden von  $\text{PGE}_2$  an Membranen im Rückenmark und sensorischen Neuronen, was eine Herunterregulierung von PG-Rezeptoren impliziert (Southall et al. 2002). Zudem konnte für die  $\text{EP}_3$ -Rezeptor-Isoform eine Agonist-induzierte Regulation der Rezeptorfunktion demonstriert werden. Der stabil in CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) exprimierte  $\text{EP}_3$ -Rezeptor unterliegt kurz- sowie langfristig einer Agonist-induzierten Desensibilisierung, wobei unter kurzfristiger Zugabe von  $\text{PGE}_2$  (30 min) eine Sequestration des Rezeptors von der Zelloberfläche weg zu beobachten war und die langfristige Zugabe (24 h) von  $\text{PGE}_2$  sogar eine Herunterregulierung der gesamten Rezeptoranzahl bewirkte (Negishi et al. 1993). Damit in Einklang stehend, sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Donaldson et al., die eine signifikante Herabregulierung der  $\text{EP}_3$ -Rezeptor mRNA 1 sowie 3 Tage nach CFA-induzierter Entzündung des Sprunggelenkes sowohl in DRG-Neuronen als auch im Rückenmark mittels rt-PCR identifizierten (Donaldson et al. 2001). Besonders hervorzuheben ist, dass von dieser Arbeitsgruppe keinerlei  $\text{EP}_3$ -Rezeptor mRNA 3 Tage nach Entzündung detektiert werden konnte. Die beobachtete Wirkungslosigkeit von ONO-AE-248 3 Tage nach Entzündungsinduktion aufgrund einer bestehenden Rezeptordesensibilisierung oder Herunterregulierung ist also durchaus denkbar.

Bezüglich unserer Ergebnisse mit dem  $\text{EP}_3$ -Rezeptor-Antagonisten kann kein eindeutiges Wirkprofil abgeleitet werden. In den 2 Einzelexperimenten (siehe Abschnitt 5.5) zeigte die Applikation des Antagonisten eine langsame Reduktion der Neuronenentladungen. In der folgenden Experimentenserie zusammen mit den  $\text{EP}_1$ -,  $\text{EP}_2$ - und  $\text{EP}_4$ -Rezeptor-Agonisten war ein diskreter Abfall auf nicht noxische Kniestimulation ersichtlich, noxische Knie- sowie die Sprunggelenksstimulation waren ohne Effekt und unter Pfotenstimulation kam es zu einer tendenziellen Steigerung der Antworten. Da auch hier keine statistische Signifikanz berechnet werden kann, lassen sich diese Ergebnisse auch schwer im Kontext zu denen mit dem  $\text{EP}_3$ -Agonisten stellen. Den hemmenden Effekt des  $\text{EP}_3$ -Agonisten unter akuten und chronischen Entzündungssituationen betrachtend, wäre ggf. eine Steigerung der Entladungen unter dem  $\text{EP}_3$ -Antagonisten zu erwarten gewesen. Da sich jedoch auch der  $\text{EP}_3$ -Agonist am Tag 3 nach Entzündungssituation als unwirksam erwies und man von einer Desensibilisierung bzw. Herabregulation des  $\text{EP}_3$ -Rezeptors ausgeht, erscheint die Wirkungslosigkeit des Antagonisten wahrscheinlicher. Zudem bildet sich in der Regel ein Effekt einer Testsubstanz eher und prominenter aus.

Dass ONO-AE-248 unter chronischen Entzündungsbedingungen erneut einen Effekt auf das Entladungsverhalten hatte, die  $\text{EP}_1$ -,  $\text{EP}_2$ - und  $\text{EP}_4$ -Rezeptor-Agonisten jedoch unwirksam



waren, legt die Vermutung nahe, dass die Prostaglandinrezeptoren im Verlauf einer Entzündung eine unterschiedliche Modulation erfahren und dass über die Regulation der Aktivität der verschiedenen PG-Rezeptoren PGE<sub>2</sub> sowohl pro- als auch antinozizeptive Eigenschaften zu haben scheint. So erfolgt ein erneuter Anstieg der COX-2 mRNA Expression ab dem 3. Tag bis zum 22. Tag nach Entzündungsinduktion (Beiche et al. 1996, 1998a) und es ist ein zweiter Anstieg der spinalen PGE<sub>2</sub>-Freisetzung 7 Tage nach Zymosan bzw. CFA-induzierter Entzündung nachweisbar (Hay et al. 1997, Maihöfer et al. 2000). Im Verlauf der Arthritis könnte so über die ebenfalls konsekutiv gesteigerte PGE<sub>2</sub>-Synthese der sensibilisierende Effekt vom PGE<sub>2</sub> über die inhibitorische Aktivität des EP<sub>3</sub>-Rezeptors limitiert werden. Im Zusammenhang damit wäre die Testung mit einem EP<sub>3</sub>-Antagonisten ebenfalls interessant gewesen.

Vermutlich unterliegt v.a. der EP<sub>3</sub>-Rezeptor in seiner Expression und Sensibilität im Verlauf einer Entzündung einer Modulation. Aufgrund der beobachteten Wirkung von ONO-AE-248 am Tag 21 nach Entzündungsinduktion ließe sich annehmen, dass es zu einer erneuten Heraufregulation der EP<sub>3</sub>-Rezeptor Expression zu diesem Zeitpunkt der Entzündung kommt. In der Tat konnte ja die Modulation des EP<sub>3</sub>-Rezeptors bis zum 3. Tag nach Entzündungsbeginn gezeigt werden (Donaldson et al. 2001). Allerdings liegen bisher keine Ergebnisse zur Rezeptorexpression unter chronischen Entzündungsstadien vor. Ob gerade der EP<sub>3</sub>-Rezeptor einer Regulation unterliegen sollte, bleibt noch zu analysieren. Möglicherweise spielt die Kolokalisation des EP<sub>3</sub>-Rezeptors mit der COX-2 (Beiche et al. 1998b) in der Form eine Rolle, als dass sich beide in ihrer Aktivität und Expression positiv beeinflussen. Dass die COX-2 während akuter und chronischer Entzündungsstadien hochreguliert ist und der EP<sub>3</sub>-Agonist während der gleichen Stadien das Antwortverhalten der Neurone unterdrückte, könnten indirekte Hinweise hierfür sein. Unter Umständen sind zusätzlich autoregulative Mechanismen oder Einflüsse anderer Transmitter-Rezeptor-Systeme auf das Expressionmuster des EP<sub>3</sub>-Rezeptors im Spiel. Generell bleibt aber auch hier anzumerken, dass der Mangel an spezifischen PG-Rezeptor-Antagonisten die Aufklärung des Anteiles eines jeden einzelnen PG-Rezeptors an der spinalen Nozizeption erschwert und dass PG-Rezeptor defekte Tieren zwar Einblicke in entsprechende Schmerzphänotypen geben können, jedoch keine Trennung zwischen peripherer und zentraler Verarbeitung erfolgt.

Zusammenfassend scheinen die PG-Rezeptorisoformen in ihrer Expression im Verlauf einer Entzündung zum Teil einem Wandel zu unterliegen. Bezüglich des Effektes der EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten unter etablierten akuten Entzündungsbedingungen (Tag 3)

ergaben sich in unseren Experimenten keine konsistenten Ergebnisse, weshalb die Bedeutung der getesteten Agonisten für die Aufrechterhaltung der spinalen Übererregbarkeit zu diesem Zeitpunkt der Arthritis nicht geklärt ist. Die Tatsache, dass in unseren Experimenten unselektive COX-Hemmer zu keiner Beeinflussung des Antwortverhaltens spinaler Hinterhornneurone führte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass spinale Prostaglandine zu diesem Zeitpunkt der Arthritis keinen weiteren Einfluss auf die Hyperexzitabilität zu haben scheinen. Ebenso weisen unsere Daten darauf hin, dass unter chronischen Entzündungsbedingungen spinalen Prostaglandinen im Modell der Antigen-induzierten Arthritis an der Aufrechterhaltung der zentralen Hyperexzitabilität über EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptoren keine Bedeutung zugeschrieben werden kann. Diese Hypothese wird von der Tatsache bekräftigt, dass spinal oder intrathekal verwendete unselektive NSAIDs unter chronischen Entzündungsbedingungen keine Wirkung auf die zentrale Hyperexzitabilität zeigten. Im Gegensatz dazu konnte ein hemmender Effekt unselektiver NSAIDs bei spinaler Applikation vor und während Induktion einer Arthritis nachgewiesen werden, was auf eine Bedeutung spinaler Prostaglandine für die Induktion der zentralen Hyperexzitabilität hinweist (Telleria-Diaz et al. 2010). Die Aussagen bezüglich der beteiligten Rezeptoren an Entstehung bzw. auch Aufrechterhaltung der zentralen Übererregbarkeit variieren dabei jedoch zum Teil erheblich. Hierbei scheint von entscheidender Rolle die Art des gewählten Studiendesigns (verschiedene Entzündungsmodelle, Verhaltensstudien, verschiedene Entzündungsphasen) zu sein. Besonders Studien mit gentechnisch veränderten Tieren erschweren die Vergleichbarkeit untereinander, da keine Unterscheidung zwischen defekten peripheren und zentralen Rezeptoren erfolgt.

Anhand unserer Ergebnisse nimmt der EP<sub>3</sub>-Rezeptor definitiv eine Sonderstellung ein. Auch er scheint im Verlauf einer Entzündung einem Wandel der Rezeptorexpression zu unterliegen. Dabei ist eine Modulation der Rezeptorexpression und -sensibilität im Verlauf einer Entzündung durch entweder autoregulatorische Prozesse oder durch den Einfluss anderer Transmittersysteme durchaus vorstellbar. Warum vor allem der EP<sub>3</sub>-Rezeptor in seiner Expression reguliert zu werden scheint, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Bezüglich der gegensätzlicher Ergebnisse zur Bedeutung des EP<sub>3</sub>-Rezeptors sowie der anderen PG-Rezeptoren muss erneut auf die Notwendigkeit einer systematischen Analyse der Unterschiede zwischen den verschiedenen Entzündungsmodellen aber auch Entzündungsphasen hingewiesen werden, um ein kohärentes Bild erstellen zu können.

## **6.7 Einfluss von unselektiven und selektiven COX-Inhibitoren auf das Antwortverhalten von Hinterhornneuronen**

Unsere Experimente zeigen nicht nur, dass sich die Wirksamkeit von nicht selektiven (Indomethacin und Diclofenac) und selektiven (NS-398) COX-Inhibitoren unterscheidet, sondern dass ebenfalls der Zeitpunkt der Entzündung einen Einfluss auf das Wirkprofil der Substanzen zu haben scheint.

So stellten wir zum einen fest, dass im Gegensatz zu den beiden getesteten unselektiven COX-Hemmern Indomethacin und Diclofenac der selektive COX-2 Inhibitor NS-398 die spinalen Antworten der abgeleiteten Hinterhornneurone auf mechanische Reizung des akut (Tag 1) und chronisch (Tag 21) entzündeten Kniegelenkes dosisabhängig und ohne ersichtliche Terminierung der Wirkung im beobachteten Zeitraum senken konnte. Die unselektiven COX-Hemmer zeigten dazu im Vergleich in allen untersuchten Entzündungsstadien keinen Einfluss auf die Entladungsraten der Hinterhornneurone.

Damit einhergehend beobachteten wir, dass die Wirksamkeit des COX-2 Hemmers NS-398 vom Entzündungsstadium abzuhängen scheint, da sich am Tag 3 nach Entzündungsinduktion kein Effekt auf die nozizeptive Signalverarbeitung nachweisen ließ.

Grundsätzlich spielen Prostaglandine sowohl in der Peripherie als auch im ZNS eine wichtige Rolle bei der nozizeptiven Signalverarbeitung. Im Bereich der peripheren Entzündung ist die Hemmung der Prostaglandinsynthese der allgemein anerkannte Wirkmechanismus, über den NSAIDs zur Analgesie beitragen (Heppelmann et al. 1986, Taiwo & Levine 1990, Ueno et al. 2001).

Auf spinaler Ebene scheint jedoch die ursprüngliche Annahme, dass die Hemmung der Prostaglandinsynthese der Grund der spinalen Antinozizeption ist, nicht von allgemeiner Gültigkeit zu sein. Hier scheinen besonders der Zeitpunkt einer Entzündung und deren Einfluss auf die Signalverarbeitung im Rückenmark von entscheidender Bedeutung zu sein. So weisen eine Vielzahl von Experimenten anhand verschiedener Entzündungsmodelle (Formalin, Kaolin/Carrageenan, Zymosan, CFA) auf die Wirksamkeit von unselektiven sowie selektiven COX-Hemmern hin, sobald sie vor Entzündungsinduktion verabreicht wurden, d.h. die präventive zentrale Applikation dieser Substanzen führt zu einem in Verhaltensexperimenten zu einem abgeschwächten nozizeptiven Verhalten (Malmberg & Yaksh 1992, 1995; Chapman & Dickenson 1992; Yamamoto & Nozaki-Taguchi 1996, 2002; Dirig et al. 1998; Gühring et al. 2000; Yaksh et al. 2001) und zum anderen zu einer Hemmung der neuronalen Exzitabilität bei der direkten Ableitung von Hinterhornneuronen (Vasquez et al. 2001). Zudem blockiert die vorherige i.th. Applikation von Indomethacin oder NS-398

dosisabhängig die Entstehung NMDA und AMPA-vermittelter thermaler Hyperalgesie (Yamamoto & Sakashita 1998).

Da beide COX-Isoformen im ZNS konstitutiv exprimiert sind (Beiche et al. 1996, 1998a, 1998b; Goppelt-Strübe & Beiche 1998; Hay et al. 1997; Hay & de Belleruche 1998; Resnick et al. 1998; Ebersberger et al. 1999; Tonai et al. 1999; Gühring et al. 2000; Zhu et al. 2003) und direkt nach K/C-Injektion ins Kniegelenk eine gesteigerte PGE<sub>2</sub>-Freisetzung im Rückenmark erfolgt (Yang et al. 1996), wird eine Beteiligung beider Enzyme an der Ausbildung spinaler Hyperexzitabilität in den ersten 1-2 Stunden impliziert. Neben der deutlich gesteigerten Expression der COX-2, erfolgt ebenso auf eine leichte Steigerung der COX-1 mRNA Expression im Rückenmark nach s.c. Injektion von Zymosan (Gühring et al. 2000). Ein Beitrag COX-1 generierter Produkte an der Entstehung entzündungsassoziierter Hyperexzitabilität kann gleichermaßen nicht ausgeschlossen werden, da der spinal verabreichte COX-1 Inhibitor SC-560 die Antworten von Hinterhornneuronen auf mechanische Reizung des entzündeten Kniegelenkes in den ersten 2 h nach Entzündungsinduktion reduzieren konnte, wenn er vor und während der Arthritisinduktion verabreicht wurde (Telleria-Diaz et al. 2010). Dass bei naiven Tieren die spinale Applikation von PGE<sub>2</sub> (Vasquez et al. 2001) oder EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Agonisten (Bär et al. 2004) zu einem gesteigerten Entladungsverhalten spinaler Hinterhornneurone führt, wie es im Rahmen einer peripheren Entzündung der Fall ist, verweist desgleichen auf eine Beteiligung spinaler Prostaglandine an der Ausbildung spinaler Hyperexzitabilität. So kann aus diesen Beobachtungen vermutet werden, dass sowohl selektive als auch unselektive NSAIDs über ihre Fähigkeit der Prostaglandinsynthesehemmung die Entstehung entzündungsassoziierter spinaler Hyperexzitabilität verhindern können und somit spinale Prostaglandine an der Entstehung dieser beteiligt zu sein scheinen.

Doch wie verhält es sich nun bei einer etablierten, akuten Entzündung?

Während der akuten Entzündung (Tag 1) erwies sich in unseren Experimenten nur der selektive COX-2 Inhibitor NS-398 als wirksam, die Antworten spinaler Neurone dosisabhängig zu reduzieren. Dass unselektive COX-Hemmer im Gegensatz zu selektiven COX-2 Hemmern keine Wirkung bei bestehender Entzündung zeigen, beschrieben ebenfalls andere Arbeitsgruppen. Eine Verminderung der Entladungen spinaler Neurone unter etablierten Entzündungsbedingungen ließ sich genauso wenig durch die unselektiven COX-Inhibitoren Indomethacin und Diclofenac mittels extrazellulärer Ableitung nozizeptiver Neurone feststellen (Vasquez et al. 2001, Telleria-Diaz et al. 2010), wie eine verringerte thermale Hyperalgesie durch Ibuprofen in Verhaltensexperimenten von Yaksh et al. (1998).

Demgegenüber wurden 2h, 6h und 2 Tage nach Zymosaninjektion in die Pfote durch i.th. verabreichtes Celecoxib (Reinhold et al. 2005) bzw. 2h nach Carrageenan-induzierter Entzündung durch i.th. appliziertes NS-398 (Yamamoto & Nozaki-Taguchi 1997; Ibuki et al. 2003) eine signifikante und dosisabhängige Antinozizeption bzw. verminderte thermale Hyperalgesie dokumentiert. Auch 48 h nach CFA-induzierter Entzündung der Pfote konnte durch i.th. appliziertes NS-398 eine signifikante Verringerung der mechanischen Hyperalgesie nachgewiesen werden (Samad et al. 2001). Ebenso führten bei Telleria-Diaz et al. erst die selektiven COX-2 Hemmer L-745,337 bzw. NS-398 zu einer signifikanten Reduktion der Entladungen spinaler Hinterhornneurone bei einer etablierten Entzündung, während Indomethacin und Diclofenac ohne Wirkung blieben (Telleria-Diaz et al. 2010). Demgegenüber zeigen Dirig et al., dass sich ca. 3 h nach K/C-induzierter thermaler Hyperalgesie der Pfote keine Änderung der Wegziehlatenzen durch die i.th. Gabe des COX-2 Hemmers SC-58125 einstellt (Dirig et al. 1998).

Wodurch ist nun aber die beobachtete Wirkungslosigkeit der unselektiven COX-Inhibitoren im Vergleich zu den selektiven COX-2 Hemmern bei etablierter Entzündung zu erklären? Was ist die Begründung für diese offensichtliche Diskrepanz im Wirkungsprofil unselektiver und COX-2 selektiver NSAIDs bei einer etablierten Entzündung im Gegensatz zu einer Entzündung, die im Entstehen begriffen ist?

Zum einen kann aus der Wirkungslosigkeit der unselektiven NSAIDs geschlossen werden, dass in einem Stadium der etablierten Hyperexzitabilität zentraler Rückenmarksneurone spinale Prostaglandine eher von geringerer Bedeutung für die Aufrechterhaltung dieser zu sein scheinen (Vasquez et al. 2001). Die Tatsache, dass erneut spinal appliziertes  $\text{PGE}_2$  bei bereits induzierter spinaler Hyperexzitabilität zwar zu gesteigerten Entladungsraten von Hinterhornneuronen führt, dies aber in deutlich geringerem Maße, würde diese Aussage bekräftigen (Vasquez et al. 2001). Ebenso ließ sich nur durch den topisch aufgetragenen  $\text{EP}_1$ -Agonisten, nicht aber durch den  $\text{EP}_2$ - oder  $\text{EP}_4$ -Agonisten, eine Steigerung der neuronalen Antworten erzeugen (Bär et al. 2004). In unseren Experimenten zeigte keiner der getesteten  $\text{EP}_1$ -,  $\text{EP}_2$ - und  $\text{EP}_4$ -Agonisten einen tiefen Effekt auf das Entladungsverhalten hyperexzitabler Neurone. Diese Ergebnisse sprechen somit dafür, dass im Zustand der etablierten spinalen Hyperexzitabilität die kontinuierliche Präsenz von Prostaglandinen eher weniger für die Aufrechterhaltung dieses Stadiums notwendig zu sein scheint.

Die Tatsache aber, dass COX-2 Inhibitoren einen hemmenden Einfluss auf die nozizeptive Transmission ausüben und dass die COX-2 mRNA Expression im Verlauf einer Entzündung

einer Modulation unterliegt, während das Expressionmuster der COX-1 mRNA bzw. Protein eher unverändert bleibt (Beiche et al. 1996, Ebersberger et al. 1999, Gühring et al. 2000), spricht gegen diese Hypothese und dafür, dass COX-2 generierte Produkte an der Aufrechterhaltung der Hyperexzitabilität beteiligt sind. Jedoch hätten in dem Fall ebenso die unselektiven Inhibitoren einen hemmenden Effekt auf die Nozizeption zeigen müssen. Dies und die Tatsache, dass i.th. verabreichtes PGE<sub>2</sub> den antinozizeptiven Effekt von i.th. verabreichten Indomethacin und Flurbiprofen (Gühring et al. 2002, Ates et al. 2003) nicht aufheben bzw. umkehren konnte, lässt Zweifel an der Prostaglandinhypothese als alleinige Begründung für die spinale Antinozizeption aufkommen. Vielmehr lässt sich hierdurch ein Einfluss der COX-2 Hemmung auf andere spinale Signaltransduktionswege vermuten.

Hinsichtlich dessen sind endogene Cannabinoide schon seit längerem in den Fokus getreten. Neben peripheren und zentralen Wirkkomponenten wird ihnen auch auf spinaler Ebene eine entscheidende Rolle bei der Modulation von nozizeptiven Signalen zugeschrieben (Farquhar-Smith et al. 2000). Cannabinoid-Rezeptor Agonisten können beispielsweise am Hinterhorn neben der Reduktion von Amplitude und Frequenz spontaner EPSCs über die Hemmung der Freisetzung von schnell wirkenden Aminosäuretransmittern wie Glutamat oder den Neuropeptiden SP und CGRP aus Primärafferenzen zur Analgesie beitragen (Richardson et al. 1998, Freund et al. 2003). Der i.th. verabreichte Cannabinoid-Rezeptor-Antagonist SR 141716A bewirkt bei naiven Mäusen einen hyperalgetischen Zustand, was auf eine tonische Cannabinoid-Rezeptoraktivität hinweist (Richardson et al. 1997). Zudem gibt es Indizien, dass Endocannabinoide ebenfalls bei der NSAID-vermittelten Hemmung der spinalen Freisetzung von CGRP beteiligt zu sein scheinen, da sich auch hier wiederum die Flurbiprofen-initiierte Hemmung der CGRP-Freisetzung durch AM-251 umkehren ließ, nicht aber durch PGE<sub>2</sub> (Seidel et al. 2003). Als endogene Cannabinoide operieren dabei u.a. Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), welche über CB<sub>1</sub>- und CB<sub>2</sub>-Rezeptoren agieren. CB<sub>1</sub>-Rezeptoren werden im peripheren und zentralen Nervensystems exprimiert und weisen im Speziellen eine große Dichte im Hinterhorn und DRG-Neuronen auf (Rice et al. 2002, Freund et al. 2003). CB<sub>2</sub>-Rezeptoren sind normalerweise in geringerem Maße im Rückenmark exprimiert und scheinen eher bei neuropathischen als inflammatorischen Schmerzen eine Rolle zu spielen (Zhang et al. 2003). AEA wird vornehmlich durch die Fettsäure-Amid-Hydrolase (FAAH) metabolisiert, während 2-AG vor allem durch die Monoacylglycerol-Lipase (MAGL) abgebaut wird, jedoch auch zum Teil durch die FAAH metabolisiert werden kann (Jhaveri et al. 2007). Für einige unselektive COX-Inhibitoren (Ibuprofen, Ketorolac, Flurbiprofen, Diclofenac, Naproxen, Indomethacin)

konnte ein hemmender Effekt auf die FAAH-Aktivität demonstriert werden (Fowler et al. 1997, 1999; Holt et al. 2003), was folglich in erhöhten Cannabinoid-Spiegeln resultiert. Interessanterweise sind AEA und 2-AG ebenso Substrat der COX-2, wobei 2-AG präferentiell durch die COX-2 oxidiert wird (Kozak & Marnett 2002). Hierbei entstehen eine Vielzahl von AEA und 2-AG Metaboliten wie PG-Ethanolamide und PG-Glycerolester (Jhaveri et al. 2007). Dabei scheint die COX-2 eine Endocannabinoid inaktivierende Funktion zu haben, da beispielsweise für einige PG-Ethanolamide gezeigt werden konnte, dass sie nicht an CB<sub>1</sub>-Rezeptoren binden (Kozak & Marnett 2002). So wäre es hier auch durchaus denkbar, dass bei einer etablierten Entzündung die Aufrechterhaltung der spinalen Hyperexzitabilität über die Inaktivierung endogener Cannabinoide via COX-2 stattfindet. Im Umkehrschluss könnten COX-2 Hemmer ihre analgetische Wirkung über einen gesteigerten Endocannabinoidtonus ermöglichen (Kozak & Marnett 2002). Andererseits induziert beispielsweise der COX-2 Metabolit von 2-AG (PGE<sub>2</sub>-Glycerolester) eine verstärkte thermale Hyperalgesie und mechanische Allodynie, was bedeutet, dass die COX-2 über die Metabolisierung von endogenen Cannabinoiden ebenso einen pronozizeptiven Effekt ausüben kann (Hu et al. 2008). Allerdings applizierten Hu et al. sämtliche Substanzen peripher (intraplantar). Inwieweit COX-2 Metabolite von 2-AG ebenso pronozizeptiv auf spinaler Ebene sein können, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Bereits 2003 beschrieben Gühring et al. und Ates et al. in Verhaltenstudien eine mögliche Interaktion von COX-Inhibitoren mit dem Endocannabinoidsystem (Gühring et al. 2002, Ates et al. 2003). Sie postulierten, dass im Formalin-Test die von ihnen getesteten unselektiven COX-Hemmer Indomethacin und Flurbiprofen, unabhängig von der Prostaglandinsynthesehemmung, auf wenigstens 3 Wegen im Rückenmark zur Antinozizeption beitragen: erstens führt die Inhibition der COX zu einer Akkumulation von Arachidonsäure, die ihrerseits vermehrt zu Endocannabinoiden umgewandelt werden („Endocannabinoid-Shift“), zweites hemmt Indomethacin die FAAH, wodurch die Degradation von endogenen Cannabinoiden verhindert wird und drittens inhibiert Indomethacin die NO-Synthese, was einerseits in einem reduzierten Abbau der Endocannabinoiden resultiert und andererseits in geringeren Konzentrationen des pronozizeptiven NOs (Gühring et al. 2002). Diese Schlussfolgerungen zogen sie aus folgenden Beobachtungen: die durch die i.th. Gabe von Indomethacin bzw. Flurbiprofen induzierte Antinozizeption im Formalin-Test (i.th. Applikation jeweils vor Entzündungsinduktion) konnte durch die jeweilige Coadministration eines CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten (AM-251), nicht aber durch PGE<sub>2</sub>, rückgängig gemacht werden (Gühring et al.

2002, Ates et al. 2003). Gleichsam wurde die durch Indomethacin verursachte Antinozizeption bei Zymosan induzierter, thermaler Hyperalgesie der affektierten Pfote durch den CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten AM-251 umgekehrt. Außerdem erwies sich Indomethacin in CB<sub>1</sub>-Rezeptor knockout Mäusen als wirkungslos, Formalin induziertes Schmerzverhalten zu reduzieren, wodurch eine Verbindung zwischen Cyclooxygenasehemmung und Antinozizeption durch endogene Cannabinoide impliziert wird (Gühring et al. 2002).

Jener Interaktion zwischen COX-Hemmung und Endocannabinoidsystem gingen auch Telleria-Diaz et al. in umfangreichen Untersuchungen nach. Im Gegensatz zu Gühring et al. und Ates et al. konnten sie zeigen, dass bei einer bestehenden akuten Entzündung die spinale Applikation von unselektiven COX-Hemmern keinen Effekt auf extrazellulär abgeleitete Hinterhornneurone hatte. Allerdings bewirkten die selektiven COX-2 Hemmer L-745,337 und NS-398 eine Umkehr der entzündungsinduzierten spinalen Hyperexzitabilität, die wiederum durch die Coadministration des CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten AM-251 geblockt wurde und die Entladungsraten der abgeleiteten Neurone wieder anstiegen (Telleria-Diaz et al. 2010). Interessanterweise bewirkte die sofortige und gleichzeitige Applikation des COX-2 Hemmers und AM-251 keine Änderung der Entladungen. Auch zeigte die Administration von Indomethacin allein bzw. mit AM-251 zusammen keine Änderung der Antworten. Erst durch die Vorbehandlung mit dem COX-2 Hemmer ließen sich die Antworten der Hinterhornneurone durch AM-251 wieder steigern, was eine selektive Beeinflussung des Endocannabinoidsystems durch die Hemmung der COX-2 impliziert. Diesbezüglich untersuchten sie zudem die spinale Prostaglandin- und 2-AG-Konzentration. Während alle COX-Hemmer zu einer reduzierten spinalen PGE<sub>2</sub>-Freisetzung führten, kam es zu keiner Änderung der spinalen 2-AG-Freisetzung unter dem selektiven COX-2 Hemmer NS-398, während es unter Indomethacin zu einer deutlichen Reduktion kam. Aus ihren Untersuchungen schlossen Telleria-Diaz et al., dass nicht die Hemmung der spinalen Prostaglandinsynthese Grund der spinalen Antinozizeption zu sein scheint, sondern der selektive Einfluss des COX-2 Hemmers auf den Endocannabinoidmetabolismus (Telleria-Diaz et al. 2010).

Wodurch lässt sich jedoch die unterschiedliche Wirksamkeit der unselektiven und selektiven COX-Hemmer bei Gühring et al. und Ates et al. im Vergleich zu den Ergebnissen von Telleria-Diaz et al. erklären? Dabei muss Folgendes bedacht werden: die Versuche von Telleria-Diaz et al. wurden während einer etablierten, akuten Arthritis durchgeführt. Gühring et al. und Ates et al. haben die getesteten unselektiven COX-Hemmer vor Entzündungsinduktion appliziert, d.h. während der Etablierung der spinalen



Hyperexzitabilität. Wie bereits ausführlich dargestellt, scheinen spinale Prostaglandine an der Entstehung spinaler Hyperexzitabilität beteiligt zu sein. Somit ist die von Gühring et al. und Ates et al. beobachtete Antinozizeption durchaus auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese zurückzuführen. Die zeitliche Komponente der Wirkstoffapplikation sowie der Zeitpunkt der Entzündung könnten somit zumindest teilweise als Erklärung für die beobachteten Wirkunterschiede dienen.

Des Weiteren wäre bei Gühring et al. und Ates et al. die Bestimmung der spinalen PG- und Endocannabinoidkonzentrationen wünschenswert gewesen, wodurch ein möglicher Effekt auf den von ihnen postulierten Einfluss des Endocannabinoidmetabolismus genauer zu beurteilen gewesen wäre. Dies ist allerdings nicht erfolgt. Zwar konnte für einige unselektive NSAID ein hemmender Effekt auf die FAAH, welche Anandamid abbaut, festgestellt werden (Holt et al. 2003), weshalb man bei den Experimenten von Telleria-Diaz et al. eine Abnahme der Neuronenentladungen hätte sehen müssen. Da sich aber unter etablierten Entzündungsbedingungen keine Reduktion des Entladungsverhaltens extrazellulär abgeleiteter Neurone unter Ibuprofen und Diclofenac einstellte (Vasquez et al. 2001, Telleria-Diaz et al. 2010), scheint die Bedeutung des Endocannabinoids Anandamid im Zusammenhang mit der Anwendung von unselektiven COX-Hemmern eher limitiert zu sein (Telleria-Diaz et al. 2010). Alternativ wäre hier ebenso denkbar, dass, ist das Endocannabinoidsystem erst einmal aktiviert, die Aktivität der FAAH eher abnimmt und alternative Metabolisierungswege von größerer Bedeutung sind (Jhaveri et al. 2007). Warum aber selektive COX-Hemmer gegenüber unselektiven bei einer etablierten Entzündung wirksam waren, ist noch unklar. Ebenso die Frage, warum Indomethacin und Diclofenac den Abbau von 2-AG im Vergleich zu NS-398 nicht hemmen konnten (Telleria-Diaz et al. 2010). Eine Erklärung könnten mögliche Wirkunterschiede bezüglich des Angriffsortes der verschiedenen COX-Hemmer sein, d.h. aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der COX-1 (v.a. DRG-Neurone) und COX-2 (v.a. Rückenmark) könnten heterogene spinale Effekte infolge der unselektiven COX-Hemmer resultieren, die sich in der Summe aufheben (Telleria-Diaz et al. 2010). Andererseits konnte gezeigt werden, dass der antinozizeptive Effekt von COX-2 Hemmern deutlich reduziert wurde, sobald ein unselektiver COX-Hemmer oder aber selektiver COX-1 Hemmer gleichzeitig appliziert wurde (Telleria-Diaz et al. 2010). Möglicherweise wirken COX-1 generierte Metabolite denen der COX-2 entgegen oder aber COX-1 Produkte werden für COX-2 abhängige Stoffwechselwege benötigt (Telleria-Diaz et al. 2010).

Weitere Hinweise, dass die COX-2 den Endocannabinoidmetabolismus beeinflusst, werden durch folgende Beobachtungen bekräftigt. Zum einen konnten COX-2 Metabolite von AEA in verschiedenen Geweben von FAAH knockout Mäusen, die exogen appliziertes AEA erhielten (Weber et al. 2004), sowie COX-2 Metabolite von 2-AG in Ratten (Hu et al. 2008) detektiert werden. Zum anderen konnte in elektrophysiologischen Ableitungen von WDR-Neuronen unter dem spinal applizierten selektiven COX-2 Hemmer Nimesulid eine signifikante Reduktion der Entladungsrate auf nicht noxische und noxische mechanische Reizung durch von Frey-Filamenten erzeugt werden, welche durch den CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist AM-251 wieder aufgehoben wurde (Staniaszek et al. 2010). Auch hier wurden die spinalen Endocannabinoidspiegel gemessen, wobei reduzierte AEA-Konzentrationen neben unbeeinträchtigten 2-AG-Spiegeln auffielen (Staniaszek et al. 2010). Hierbei wird deutlich, dass der Einfluss der COX-2 Hemmung auf den Endocannabinoidmetabolismus sehr komplex zu sein scheint. Der Mechanismus, über den der COX-2 Hemmer Nimesulid einen CB<sub>1</sub>-Rezeptor abhängigen Effekt bei nicht etwa erhöhten Endocannabinoidleveln, sondern erniedrigten AEA und gleich gebliebenen 2-AG Konzentrationen bewirkte, bleibt unklar (Staniaszek et al. 2010). Auch bei Telleria-Diaz et al. blieben die 2-AG Konzentrationen stabil (Telleria-Diaz et al. 2010). Eine mögliche Erklärung für die stabil bzw. erniedrigten Endocannabinoidspiegel wäre die Metabolisierung von AEA und 2-AG durch andere Enzyme wie Lipoxygenasen und Cytochrom P450 Enzyme. Deren Metabolite besitzen eine zum Teil höhere Bindungsaffinität zum CB<sub>1</sub>-Rezeptor als AEA und 2-AG selber (Staniaszek et al. 2010) und könnten somit eine cannabimimetische Wirkung ausüben (Kozak & Marnett 2002, Staniaszek et al. 2010). Es ist also durchaus denkbar, dass COX-2 Hemmer zum einen über eine Hemmung des endogenen Cannabinoidabbaus und zum anderen über eine Modulation des Cannabinoidmetabolismus zur spinalen Antinozizeption beitragen.

Insgesamt erscheint der Einfluss der COX-2 sowie der COX-2 Hemmung auf den Cannabinoidstoffwechsel sehr komplex und bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenso eröffnen die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen selektiven und unselektiven COX-Hemmern in Abhängigkeit vom Entzündungsstadium eine Reihe von neuen Fragen bezüglich der COX-Funktionen sowie Interaktionen zum einen untereinander, zum anderen mit anderen Systemen, die mit unterschiedlichen Versuchsansätzen geklärt werden müssen.

### **6.7.1 Effekt von Diclofenac, Indomethacin und NS-398 im Verlauf der Arthritis**

Neben der Beobachtung, dass die unselektiven COX-Inhibitoren Diclofenac und Indomethacin sowohl bei einer etablierten akuten (Tag 1 und 3) als auch chronischen Arthritis

(Tag 21) keinen Einfluss auf das Antwortverhalten von spinalen Hinterhornneuronen hatten, offenbarte sich folgende andere, interessante Beobachtung. Obwohl unter akuten (Tag 1) und chronischen Entzündungsbedingungen (Tag 21) der selektive COX-2 Hemmer NS-398 zu einer signifikanten Reduktion der Entladungen führte, blieb diese Wirkung am Entzündungstag 3 völlig aus. Wie bereits bei dem EP<sub>3</sub>-Rezeptor Agonisten beobachtet, scheint auch die Wirkung des COX-2 Hemmers vom Zeitpunkt des Entzündungsstadiums abzuhängen.

Betrachtet man den Zeitverlauf der COX-2 mRNA Expression erscheint dieses Wirkprofil nicht verwunderlich. Beiche et al. stellten eine zweigipflige Erhöhung der COX-2 mRNA Expression fest: 6 h nach CFA-induzierter Entzündung der Pfote sowie 22 Tage danach. Wenn auch in einem geringeren Ausmaß, ließen sich die gleichen Veränderungen für die COX-2 Proteinspiegel nachweisen, wobei allerdings ein Anstieg innerhalb der ersten 12 h zu verzeichnen war. In den zwischenzeitlichen Messungen ergab sich ein Abfall der COX-2 mRNA von 6 h an mit einem Tiefpunkt 3 Tage nach Entzündungsbeginn, wobei diese Werte denen der Baseline vor Entzündungsinduktion glichen (Beiche et al. 1996, 1998a). Ebenso Hay et al. und Ebersberger et al. untersuchten die Expression der spinalen COX-1 und COX-2 mRNA sowie des Proteingehaltes. Beide stellten eine ähnliche Modulation der COX-2 Expression fest, indem sich ein Anstieg bzw. Kumulation der COX-2 mRNA Expression 2-4 h nach CFA-induzierter Entzündung einstellte (Hay et al. 1997) und die COX-2 Proteinlevel einen 4-fachen Anstieg 3 und 6 h sowie einen 6-fachen Anstieg 12 h nach K/C-induzierter Kniegelenksentzündung verzeichneten (Ebersberger et al. 1999). Im Vergleich zu Beiche et al. stellten Hay et al. nach Erreichen eines Höhepunktes der COX-2 mRNA Expression 4 h nach CFA-Injektion einen steten Abfall der COX-2 mRNA sowohl 24h als auch 7 Tage nach Entzündungsinduktion fest, ermittelten jedoch keine weiteren Werte am 3. bzw. 22. Tag, wie Beiche et al.. Dahingegen beobachteten Maihöfner et al. wie Beiche et al. einen biphasischen Verlauf: 8 h nach Zymosaninjektion in die Pfote kam es zu einem signifikanten Zuwachs COX-2 immunreaktiver Neurone im Hinterhorn gefolgt von einem Abfall 24 h später und einem zweiten Anstieg sowohl 4 als auch 7 Tage nach Injektion (Maihöfner et al. 2000).

Mit der gesteigerten Expression der COX-2 gehen zugleich eine gesteigerte PGE<sub>2</sub>-freisetzung sowie ein verändertes nozizeptives Verhalten einher. Dabei beobachteten verschiedene Arbeitsgruppen einen manifesten Anstieg der PGE<sub>2</sub>-freisetzung 3, 6 (Ibuki et al. 1997), 8 (Hay et al. 1997, Gühring et al. 2000), ca. 9-11 (Ebersberger et al. 1999) oder 15 h (Nakayama et al. 2002) nach Induktion der Entzündung mit CFA, Zymosan oder K/C. Die Tiere zeigten eine deutliche Allodynie (Hay et al. 1997) und Hyperalgesie (Hay &

deBelleruche 1997), die sich nach 3 bzw. 4 h entwickelte. 7 Tage nach Entzündungsinduktion mit Zymosan erreichten die Werte der spinalen  $\text{PGE}_2$ -freisetzung allerdings Ausgangswerte wie vor Induktion der Entzündung (Gühring et al. 2000). Andererseits sprechen Mäihöfner et al. 7 Tage nach Zymosan-induzierter Entzündung von signifikant erhöhten spinalen  $\text{PGE}_2$ -Werten im Vergleich zu Kontrolltieren (Maihöfner et al. 2000) und auch Hay et al. beobachteten einen zweiten Anstieg der spinalen  $\text{PGE}_2$ -Freisetzung im Zeitraum von 7 Tagen (Hay et al. 1997).

Welche Schlüsse lassen sich aus diesen Beobachtungen bezüglich der Bedeutung der COX-2 und des Einflusses von Prostaglandinen auf die spinale Hyperexzitabilität im Verlauf einer Arthritis ziehen?

Obwohl die Untersuchungen nicht zu einheitlich definierten Zeitpunkten durchgeführt wurden, lässt sich zum einen feststellen, dass die Expression der COX-2 im Wechsel von einer akuten zu einer chronischen Entzündung einem dynamischen Wandel unterliegen muss. Dabei scheint es allerdings erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Entzündungsmodellen zu geben. In den hier dargestellten Arbeiten kamen Zymosan, CFA und Carrageenan als Entzündungsinduktoren zum Einsatz. Möglicherweise sind die verschiedenen Ergebnisse und Verläufe bzgl. COX-2 Expression und  $\text{PGE}_2$ -Freisetzung ein Hinweis darauf, dass innerhalb der Entzündungsmodelle ein abweichendes Expressionsverhalten der einzelnen Transmittersysteme vorhanden ist und somit ein unterschiedlicher Beginn und Zeitverlauf von nozizeptiven Inputs und Antworten stattfindet (Honoré et al. 1999).

Der bei Beiche et al. festgestellte Tiefpunkt der COX-2 mRNA Expression könnte dabei durchaus im Zusammenhang mit dem in unseren Experimenten beobachteten Wirkverlust des selektiven COX-2 Hemmers am Tag 3 nach Arthritisinduktion gewertet werden. Wie in den vorangehenden Kapiteln ausführlich beschrieben, scheinen Prostaglandine an der Aufrechterhaltung der spinalen Hyperexzitabilität im Rahmen einer etablierten Entzündung eher von geringerer Bedeutung zu sein (Vasquez et al. 2001). Unsere Ergebnisse aus den Experimenten mit den verschiedenen PG-Rezeptor-Agonisten sowie selektiven und unselektiven COX-Hemmern zum Tag 3 nach Arthritisinduktion stehen dabei, wie bereits ausführlich diskutiert, im Einklang mit dieser Hypothese. Welche Mediatoren an der beobachteten Herunterregulierung der COX-2 einbezogen sind, gibt viel Raum für Hypothesen. So sind negative Feedbackmechanismen im COX-PG-System genauso vorstellbar, wie modulatorische Einflüsse durch andere Neurotransmitter. Inwiefern allerdings das Cannabinoidsystem im Rückenmark in seiner Expression und Aktivität im Verlauf einer

Entzündung modifiziert wird, ist unklar. Ob auch hier eine Unempfindlichkeit gegenüber eintreffenden Stimuli eintritt oder ob im Rückenmark generell sämtliche Transmitter-Rezeptor-Systeme nach Etablierung einer tiefen akuten Entzündung herunterreguliert werden, muss zukünftig geklärt werden.

Analog zum zweigipfligen Expressionsverhalten der COX-2 mRNA (Beiche et al. 1996, 1998a; Maihöfner et al. 2000) führte in unseren Experimenten der selektive COX-2 Hemmer NS-398 zum Zeitpunkt einer chronischen Arthritis (Tag 21) erneut zur spinalen Antinozizeption. Auch hier lässt sich vermuten, dass nicht die Prostaglandinsynthesehemmung sondern die Beeinflussung des Endocannabinoidsystems als Wirkmechanismus angesehen werden kann. Die spinale Testung eines CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten nach Vorbehandlung durch einen COX-2 Hemmer wie bei Telleria-Diaz et al., jedoch unter chronischen Entzündungsbedingungen, wäre diesbezüglich sehr aufschlussreich. Im Zusammenhang damit wären Bestimmungen des spinalen Gehaltes von Prostaglandinen, Endocannabinoiden sowie der Cannabinoidrezeptorexpression von besonderem Interesse. Leider beschränken sind die bis dato vorhandenen Studien, die jene Sachverhalte untersuchen und damit die vermutete Interaktion zwischen dem COX-Prostaglandin-System und endogenen Cannabinoiden aufzuschlüsseln versuchen v.a. auf akute Entzündungsverhältnisse und weniger auf chronische Entzündungsbedingungen, wodurch eine vergleichende Interpretation unserer Ergebnisse möglich gewesen wäre. Dies verdeutlicht umso mehr, dass, um die Pathophysiologie von chronischen Schmerzen besser verstehen zu können, mehr Augenmerk auf chronische Entzündungsbedingungen gelegt werden muss.

## 6.8 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann aufgrund unserer Ergebnisse folgendes vermutet werden:

Erstens scheinen spinale Prostaglandine bei einer etablierten akuten Entzündung keinen entscheidenden Einfluss auf die Aufrechterhaltung der bestehenden spinalen Hyperexzitabilität zu haben. Dass die spinal applizierten EP<sub>1</sub>-, EP<sub>2</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor Agonisten zu keinem Zeitpunkt der Arthritis einen deutlichen Effekt auf die Signalverarbeitung im Hinterhorn hatten, steht im Einklang mit dieser Hypothese. So scheint die Präsenz von Prostaglandinen, ist die zentrale Hyperexzitabilität im Rahmen einer Entzündung erst einmal etabliert, nicht mehr notwendig für den Fortgang dieser zu sein. Ganz im Gegensatz dazu konnte für den EP<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten eine antinozizeptive Wirkung festgestellt werden. Dies zeigt die Komplexität dieses Systems und ist möglicherweise ein

Hinweis darauf, dass spinale Prostaglandine je nach Art des aktivierten Prostaglandinrezeptors sowohl pro- als auch antinozizeptive Effekte haben können.

Im Zusammenhang damit war ein weiteres Merkmal auffällig. Sowohl die Wirkung des EP<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten als auch die des selektiven COX-2 Hemmers NS-398 schien vom Zeitpunkt der Entzündung abzuhängen. So waren beide Substanzen unter akuten (Tag 1) und chronischen Entzündungsbedingungen (Tag 21) wirkungsvoll, nicht jedoch während einer fortgeschrittenen akuten Entzündung (Tag 3). Diese zeitliche Komponente im Wirkprofil der getesteten Substanzen lässt somit einen dynamischen Wandel der spinalen Rezeptorausstattung sowie Enzymexpression des COX-Prostaglandin-Systems in Abhängigkeit vom Entzündungsstadium annehmen. Inwieweit hierbei mögliche negative Feedback-Mechanismen oder die Modulation durch andere Transmittersysteme eine Rolle spielen, muss Gegenstand weitere Untersuchungen sein.

Angesichts der beobachteten Wirkungslosigkeit unselektiver COX-Hemmer während sämtlicher Entzündungsphasen im Vergleich zur profunden antinozizeptiven Wirkung von NS-398 müssen alternative Wirkmechanismen anstelle der Prostaglandinsynthesehemmung angenommen werden. Hierbei ist innerhalb der letzten Jahre besonders die Interaktion mit dem Endocannabinoidsystem in den Fokus der Betrachtung getreten. Da unter akuten Entzündungsbedingungen ein Zusammenhang zwischen COX-2 Hemmung und Modulation des Endocannabinoidsystems mehrfach gezeigt werden konnte, sind gleichartige bzw. ähnliche Mechanismen unter chronischen Entzündungsbedingungen zu vermuten. In Anbetracht der Ergebnisse mit NS-398 muss angenommen werden, dass bei einer profunden Entzündung die antinozizeptive Wirkung via COX-2 Hemmung ebenso über die Beeinflussung des Endocannabinoidsystems erfolgt und im Umkehrschluss COX-2 generierte Produkte der endogenen Cannabinoide AEA und 2-AG an der Aufrechterhaltung der spinalen Hyperexzitabilität beteiligt zu sein scheinen und nicht spinale Prostaglandine.

Warum allerdings, trotz COX-2 inhibierender Wirkkomponente unselektiver COX-Hemmer, diese unter etablierten und chronischen Entzündungsbedingungen keinen Effekt auf die spinale Hyperexzitabilität zeigen, bleibt Gegenstand weiterer intensiver Forschung. Unter Umständen spielen hier die verschiedene zentrale Verteilung der COX-1 und COX-2 aber auch eine Interaktion untereinander eine Rolle (Telleria-Diaz et al. 2010).

Es bleiben folglich eine Vielzahl von Fragen bezüglich der COX-Funktion und Interaktion mit anderen Transmittersystemen offen, die zukünftig mit verschiedenen Untersuchungsansätzen geklärt werden müssen.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Abbadie C, Trafton J, Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI (1997) Inflammation increases the distribution of dorsal horn neurons that internalize the neurokinin-1 receptor in response to noxious and non-noxious stimulation. *The Journal of Neuroscience* 17(20): 8049-8060.

Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU (2002) PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5: 34-40.

Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1999) Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signalling pathways. *Arthritis Rheum.* 42(4): 710-718.

Allen AL, Cortright DN, McCaeson KE (2003) Formalin- or adjuvant-induced peripheral inflammation increases neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse. *Brain Res.* 961(1): 147-152.

Andreeva L, Rang HP (1993) Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the rat spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol* 108: 185-190.

Ates M, Hamza M, Seidel K, Kotalla CE, Ledent C, Gühring H (2003) Intrathecally applied fluriprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. *European Journal of Neuroscience* 17: 597-604.

Azad AC, Zieglgänsberger W (2003) Was wissen wir über die Chronifizierung von Schmerz? *Schmerz* 17:441-444.

Baba H, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2001) Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E<sub>2</sub>. *The Journal of Neuroscience* 21(5): 1750-1756.

Ballou LR, Botting RM, Goorha S, Zhang J, Vane JR (2000) Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *PNAS* 97(18): 10272-10276.

Bär KJ, Schurigt U, Scholze A, Segond von Banchet G, Stopfel N, Bräuer R, Halbhauer KJ, Schaible HG (2004) The expression and localization of somatostatin receptors in dorsal root ganglion neurons of normal and monoarthritic rats. *Neuroscience* 127: 197-206.

Basbaum AI, Jessell TM (1999) The perception of pain. In: Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM (eds) *Principles of neural science*, 4th edn. McGraw Hill, New York, pp 472-491.

- Bauer MK, Lieb K, Schulze-Osthoff K, Berger M, Gebicke-Härter PJ et al. (1997) Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur. J. Biochem.* 243: 726-731.
- Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Strübe M (1996) Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Letters* 390: 165-169.
- Beiche F, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Strübe M (1998a) Expression of cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation during adjuvant-induced arthritis. *Inflamm. Res.* 47: 482-487.
- Beiche F, Klein T, Nüsing R, Neuhuber W, Goppelt-Strübe M (1998b) Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *Journal of Neuroimmunology* 89: 26-34.
- Bendele AM (2001) Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskel Neuron Interact* 1(4): 377-385.
- Birrell GJ, McQueen DS, Iggo A, Coleman RA, Grubb BD (1991) PGI<sub>2</sub>-induced activation and sensitization of articular mechanonociceptors. *Neurosci Lett* 124(1): 5-8.
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 1187-1205.
- Böttger MK, Hensellek S, Richter F, Gajda M, Stöckigt R, von Banchet GS, Bräuer R, Schaible HG (2008) Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum.* 58(8): 2368-78.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR (1977) Antigen-induced arthritis in mice I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 20: 841-850.
- Brahn E (1991) Animal models of rheumatoid arthritis. Clues to etiology and treatment. *Clin Orthop Relat Res* 265: 42-53.
- Breder CD, Dewitt D, Kraig RP (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 355(2): 296-315.
- Breder CD, Smith WL, Raz A, Masferrer J, Seibert K, Needleman P, Saper CB (2004) Distribution and characterization of cyclooxygenase immunoreactivity in the ovine brain. *The Journal of Comparative Neurology* 322(3): 409-438.
- Brideau C, Kargman S, Liu S, Dallob AL, Ehrich EW, Rodger IW, Chan CC (1996) A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res* 45: 68-74.



- Brune K, Glatt M, Graf P (1976) Mechanisms of action of anti-inflammatory drugs. *General Pharmacology* 7(1):27-30.
- Butler S, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J (1992) A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain* 48(1): 73-81.
- Calza L, Pozza M, Zanni M, Manzini CU, Manzini E, Hokfelt T (1998) Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience* 82(2): 575-89.
- Cerne R, Jiang M, Randi M (1992) Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate potentiates excitatory amino acid and synaptic responses of rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Res* 596(1-2): 111-123.
- Cervero F, Schaible HG, Schmidt RF (1991) Tonic descending inhibition of spinal cord neurons driven by joint afferents in normal cats and in cats with inflamed knee joint. *Exp Brain Res* 83: 675-678.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21): 13926-13931.
- Chapman V, Dickenson Ah (1992) The spinal and peripheral roles of Bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 219(3-4): 427-433.
- Chen C, Magee JC, Bazan NG (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E<sub>2</sub> signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 87: 2851-2857.
- Chen L, Huang L-YM (1992) Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356: 521-523.
- Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Brubb BD (2000) Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. *European Journal of Neuroscience* 12: 911-920.
- Coderre TJ, Gonzales R, Goldyne ME, West ME, Levine JD (1990) Noxious stimulus-induced increase in spinal prostaglandin E<sub>2</sub> is noradrenergic terminal-dependent. *Neurosci. Lett.* 115: 253-258.
- Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993) Contribution of central neuroplasticity in pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*: 259-285.
- Craig AD, Heppelmann B, Schaible HG (1988) The projection of the medial and posterior articular nerves of the cat's knee to the spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 276(2): 279-288.

- Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T (1994) Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues – effects of interleukin-1 $\beta$ , phorbol ester, and corticosteroids. *The Journal of Clinical Investigation* 93: 1095-1101.
- Crossley MJ, Holland T, Spowage M, Hunneyball IM (1989) Monoarticular antigen induced arthritis in rabbits and mice. *Modern Methods Pharmacol.* 5: 415-439.
- Danziger N, Weil-Fugazza J, LeBars D, Bouhassira D (1999) Alteration of descending modulation of nociception during the course of monoarthritis in the rat. *The Journal of Neuroscience* 19(6): 2394-2400.
- Dirig DM, Konin GP, Isakson PC, Yaksh TL (1997) Effect of spinal cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test and in vitro prostaglandin E<sub>2</sub> release. *Eur. J. Pharmacol.* 331: 155- 160.
- Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL (1998) Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *JPET* 285: 1031-1038.
- Dirig DM, Yaksh TL (1999) In vitro prostanoid release from spinal cord following peripheral inflammation: effects of substance P, NMDA and capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 126: 1333-1340.
- Donaldson LF, Humphrey PS, Oldfield S, Giblett S, Grubb BD (2001) Expression and regulation of prostaglandin E receptor subtype mRNAs in rat sensory ganglia and spinal cord in response to peripheral inflammation. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 63. 109-122.
- Doubell TP, Mannion RJ, Woolf CJ (1999) The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: *Textbook of Pain Fourth Edition* PD Wall and R Melzack (Eds), Churchill Livingstone London: 165-181.
- Dougherty PM, Willis WD (1991) Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. *Pain* 47: 85-93.
- Ebersberger A, Grubb BD, Willingale HL, Gardinger NJ, Nebe J, Schaible HG (1999) The intraspinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclooxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience* 93(2): 775-781.
- Ebersberger A, Charbel-Issa P, Vanegas H, Schaible HG (2000) Differential effects of CGRP and CGRP 8-37 upon responses to NMDA and AMPA in spinal nociceptive neurons with knee input in the rat. *Neuroscience* 99: 171-178.
- England S, Bevan S, Docherty RJ (1996) PGE<sub>2</sub> modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurons via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.* 495(Pt 2): 429-440.

- Evans AR, Vasko MR, Nicol GD (1999) The cAMP transduction cascade mediates the PGE<sub>2</sub>-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neuron. *J Physiol* 516: 163-78.
- Fang L, Wu J, Lin Q, Willis WD (2002) Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. *The Journal of Neuroscience* 22(10): 4196-4204.
- Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice ASC, Elphick MR (2000) Cannabinoid CB1 Receptor Expression in Rat Spinal Cord. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15: 510-521.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Corrêa FMA (1978) Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *European Journal of Pharmacology* 53(1): 39-48.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB (1996) Intrathecal administration of prostaglandin E<sub>2</sub> causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm Res* 45: 499-502.
- Fowler CJ, Tiger G, Stenström A (1997) Ibuprofen Inhibits Rat Brain Deamidation of Anandamide at Pharmacologically Relevant Concentrations. Mode of Inhibition and Structure-Activity Relationship. *JPET* 283(2): 729-734.
- Fowler CJ, Janson U, Johnson RM, Wahlström G, Stenström A, Norström A, Tiger G (1999) Inhibition of Anandamide Hydrolysis by the Enantiomers of Ibuprofen, Ketorolac, and Flurbiprofen. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362(2): 191-196.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiol Rev* 83: 1017-1066.
- Geisslinger G, Muth-Selbach U, Coste O, Vetter G, Schrödter A, Schaible HG, Brune K, Tegeder I (2000) Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E<sub>2</sub> release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J. Neurochem.* 74: 2094-2100.
- Ghilardi JR, Svensson CI, Rogers SD, Yaksh TL, Mantyh PW (2004) Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 24(11): 2727-2732.
- Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD (1996) Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(3): 1108-1112.
- Gold MS (1999) Tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> currents and inflammatory hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(14): 7645-7649.

- Golden BD, Abramson SB (1999) Selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Rheum Dis Clin North Am* 25(2): 359-78.
- Goppelt-Strübe M, Beiche F (1998) Cyclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 433: 213-216.
- Griffiths RJ (1992) Characterization and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions* 35(1-2): 88-95.
- Grubb BD, Stiller RU, Schaible HG (1993) Dynamic changes in receptive field properties of spinal cord neurons with ankle input in rats with chronic unilateral inflammation in the ankle region. *Exp Brain Res* 92: 441-452.
- Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D (2004) Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1. *J Biol Chem.* 279(23): 24866-72.
- Gühring H, Görig M, Ates M, Coste O, Zeilhofer HU, Pahl A, Rehse K, Brune K (2000) Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E<sub>2</sub> production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. *The Journal of Neuroscience* 20(18): 6714-6720.
- Gühring H, Tegeder I, Lötsch J, Pahl A, Werner U, Reeh PW, Rehse K, Brune K, Geisslinger G (2001) Role of nitric oxide in zymosan induced paw inflammation and thermal hyperalgesia. *Inflamm. Res.* 50: 083-088.
- Gühring H, Hanza M, Sergejeva M, Ates M, Kotalla CE, Ledent C, Brune K (2002) A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur J Pharmacol* 454: 153-63.
- Halata Z, Badalamente MA, Dee R, Propper M (1984) Ultrastructure of sensory nerve endings in monkey (*Macaca fascicularis*) knee joint capsule. *J Orthop Res* 2(2): 169-76.
- Hamilton LC, Warner TD (1998) Interactions between inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in vivo: investigations using the selective inhibitors, 1400W and celecoxib. *British Journal of Pharmacology* 125: 335-340.
- Handwerker HO (1999) Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Hanesch U, Pfrommer U, Grubb BD, Schaible HG (1993) Acute and chronic phases of unilateral inflammation in rat's ankle are associated with an increase in the proportion of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive dorsal root ganglion cells. *European Journal of Neuroscience* 5: 154-161.

- Hanesch U, Blecher F, Stiller RU, Emson PC, Schaible HG, Heppelmann B (1995) The effect of unilateral inflammation at the rat's ankle joint on the expression of preprotachykinin-A mRNA and preprosomatostatin mRNA in dorsal root ganglion cells – a study using non-radioactive in situ hybridization. *Brain Research* 700: 279-284.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 94(6): 2504-2510.
- Hawkey CJ (1999) COX-2 inhibitors. *The Lancet* 353: 307-314.
- Hay C, de Belleruche J (1997) Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport* 8(5): 1249-1251.
- Hay C, Trevethick MA, Wheeldon A, Bowers JS, de Belleruche JS (1997) The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience* 78(3): 834-850.
- Hay C, de Belleruche JS (1998) Dexamethasone prevents the induction of COX-2 mRNA and prostaglandins in the lumbar spinal cord following intraplantar FCA in parallel with inhibition of oedema. *Neuropharmacology* 37: 739-744.
- Heppelmann B, Meßlinger K, Neiss WF, Schmidt RF (1990) Ultrastructural three-dimensional reconstruction of group III and group IV sensory nerve endings („free nerve endings“) in the knee joint capsule of the cat: evidence for multiple receptive sites. *J. Comp. Neurol.* 292: 103-116.
- Hildebrand C, Öqvist G, Brax L, Tuisku F (1991) Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat. Record.* 229: 545-555.
- Hingtgen CM, Vasko MR (1994) Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res.* 655: 51-60.
- Hingtgen CM, Waite KJ, Vasko MR (1995) Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neurosci* 15: 5411-5419.
- Hinz B, Brune K (2002) Cyclooxygenase-2–10 years later. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 300(2): 367-375.
- Hirst, WD, Young KA, Newton R, Allport VC, Marriott DR, et al. (1999) Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 13: 57-68.

- Hoheisel U, Lehmann-Willenbrock E, Mense S (1989) Termination patterns of identified group II and III afferent fibres from deep tissues in the spinal cord of the cat. *Neuroscience* 28(2): 495-507.
- Hoheisel U, Mense S (1990) Response behaviour of cat dorsal horn neurones receiving input from skeletal muscle and other deep somatic tissues. *Journal of Physiology* 426: 265-280.
- Honda T, Segi-Nishida E, Miyachi Y, Narumiya S (2006) Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E<sub>2</sub>-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *The Journal of Experimental Medicine* 203(2): 325-335.
- Honore P, Menning PM, Rogers SD, Nichols ML, Basbaum AI, Besson JM, Mantyh PW (1999) Spinal substance P receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. *The Journal of Neuroscience* 19(17): 7670-7678.
- Holt S, Fowler CJ (2003) Anandamide metabolism by fatty acid amide hydrolase in intact C6 glioma cells. Increased sensitivity to inhibition by ibuprofen and flurbiprofen upon reduction of extra - but not intracellular pH. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367:37-44.
- Hösl K, Reinold H, Harvey RJ, Müller U, Narumiya S, Zeilhofer HU (2006) Spinal prostaglandin E receptors of the EP2 subtype and the glycine receptor  $\alpha 3$  subunit, which mediate central inflammatory hyperalgesia, do not contribute to pain after peripheral nerve injury or formalin injection. *Pain* 126(1-3): 46-53.
- Hu SS-J, Bradshaw HB, Chen JS-C, Tan B, Walker JM (2008) Prostaglandin E<sub>2</sub> glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NF $\kappa$ B activity. *British Journal of Pharmacology* 153: 1538-1549.
- Hua XY, Chen P, Marsala M, Yaksh TL (1999) Intrathecal substance-P induced thermal hyperalgesia and spinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> and amino acids. *Neuroscience* 89(2): 525-534.
- Hunneyball IM, Crossley MJ, Spowage M (1986) Pharmacological studies of antigen-induced arthritis in BALB/c mice. I. Characterization of the arthritis and the effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents. *Agents Actions* 18: 384-393.
- IASP (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6(3): 248-52.
- Ibuki T, Matsumura K, Yamazaki Y, Nozaki T, Tanaka Y, Kobayashi S (2003) Cyclooxygenase-2 is induced in the endothelial cells throughout the central nervous system during carrageenan-induced hind paw inflammation; its possible role in hyperalgesia. *Journal of Neurochemistry* 86: 318-328.

- Ichitani Y, Shi T, Haeggstrom JZ, Samuelsson B, Hökfelt T (1997) Increased levels of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord after peripheral inflammation: an in situ hybridization study. *Neuroreport* 8(13): 2949-2952.
- Ikeda-Matsuo Y, Tanji H, Ota A, Hirayama Y, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y (2010) Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to ischaemic excitotoxicity through prostaglandin E<sub>2</sub> EP<sub>3</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology* 160(4): 847-859.
- Inoue A, Ikoma K, Morioka N, Kumagai K, Hashimoto T, Hide I, Nakata Y (1999) Interleukin-1 $\beta$  induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *Journal of Neurochemistry* 73: 2206-2213.
- Jacobs C, Young D, Tyler S, Callis G, Gillis S, Conlon PJ (1988) In vivo treatment with IL-1 reduces the severity and duration of antigen-induced arthritis in rats. *The Journal of Immunology* 141(9): 2967-2974.
- Jewett Ba, Gibbs LM, Tarasiuk A, Kending JJ (1992) Propofol and barbiturate depression of spinal nociceptive neurotransmission. *Anesthesiology* 77(6): 1148-54.
- Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V (2007) Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharm* 152: 624-632.
- Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ (2002) ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience* 22(2): 478-485.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210.
- Kangra I, Randic M (1990) Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamat and aspartat from rat spinal dorsal horn slice. *J.Neurosci.* 10: 2026-2038.
- Karow T, Lang-Roth R (2004) Analgetika In: Karow T, Lang-Roth R *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage.
- Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2317-2321.
- Kawasaki Y, Kohno, T, Zhuang ZY, Brenner GJ, Wang H, Van der Meer C, Befort K, Woolf CJ, Ji RR (2004) Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to c-fibre-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *The Journal of Neuroscience* 24(38): 8310-8321.

- Khasar SG, Gold MS, Levine JD (1998) A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neuroscience Letters* 256(1): 17-20.
- Kidd BL, Cruwys SC, Garrett NE, Mapp PI, Jolliffe VA, Blake DR (1995) Neurogenic influences on the contralateral responses during experimental rat monoarthritis. *Brain Res.* 688(1-2): 72-6.
- Kidd BL, Urban LA (2001) Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia* 87(1): 3-11.
- Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *British Journal of Pharmacology* 122: 217-224.
- Klein T, Magerl W, Hopf HC, Sandkühler J, Treede RD (2004) Perceptual correlates of nociceptive long-term potentiation and long-term depression in humans. *The Journal of Neuroscience* 24(4): 964-971.
- Kozak KR, Marnett LJ (2002) Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66: 211-220.
- Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL (1992) Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 293(2): 391-400.
- Kulkarni SK, Jain NK, Singh A (2000) Cyclooxygenase Isoenzymes and Newer Therapeutic Potential for Selective COX-2 Inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22(5): 291-298.
- Kumazawa T, Mizumura K, Koda H (1993) Involvement of EP<sub>3</sub> subtype of prostaglandin E receptors in PGE<sub>2</sub>-induced enhancement of the bradykinin response of nociceptors. *Brain Res* 632: 321-324.
- Kumazawa T, Mizumura K, Koda H, Fukusako H (1996) EP receptor subtypes implicated in the PGE<sub>2</sub>-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. *Journal of Neurophysiology* 75(6): 2361-8.
- Kunze A (2002) Einfluss verschiedener Clodronat-Therapieregime auf Gelenkschwellung, Entzündung, Gelenkdestruktion, gelenknahe Osteoporose und systemischen Knochenstoffwechsel im Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Ratte (Dissertation). Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lam FY, Ferrell WR (1991) Specific neurokinin receptors mediate plasma extravasation in the rat knee joint. *Br J Pharmacol* 103: 1263-1267.
- Langford LA, Schmidt RF (1983) Afferent und efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. *Anat. Rec.*, 206: 71-78.



- Levine JD, Fields HL, Basbaum AI (1993) Peptides and the primary afferent nociceptor. *The Journal of Neuroscience* 13(6): 2273-2286.
- Light AR, Perl ER (1979) Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibres. *J Comp Neurol* 186(2): 133-150.
- Lindsay RM, Hamar AJ (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337: 362-364.
- Lipsky LP, Abramson SB, Crofford L, Dubois RN, Simon LS, van de Purre LB (1998) The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 25(12): 2298-303.
- Ma W, Eisenach JC (2002) Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience* 15: 1037-1047.
- Maihöfner C, Tegeder I, Euchenhofer C, Dewitt D, Brune K, Bang R, Neuhuber W, Geisslinger G (2000) Localization and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthetase in mouse spinal cord. *Neuroscience* 101(4): 1093-1108.
- Maihöfner C, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundörfer B, Heuss D (2003) Expression and localization of cyclooxygenase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience* 18: 1527-1534.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1992) Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *JPET* 236: 136-146.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1994) Capsaicin-evoked prostaglandin E<sub>2</sub> release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 271(2-3): 293-9.
- Malmberg AB, Rafferty MF, Yaksh TL (1994) Antinociceptive effect of spinally delivered prostaglandin E receptor antagonists in the formalin test on the rat. *Neurosci Lett.* 173(1-2): 193-6.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1995a) Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and capsaicin on behaviour and cerebrospinal fluid amino acids concentrations of unanesthetized rats: a microdialysis study. *Journal of Neurochemistry* 65: 2185-2193.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1995b) Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J. Neurosci.* 15: 2768-2776.

- Malmberg AB, Yaksh TL (1995c) The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1069-1075.
- Malmberg AB, Brandon EP, Idzerda RL, Liu H, McKnight GS, Basbaum AI (1997) Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type 1 regulatory subunit of cAMP-dependent Protein kinase. *The Journal of Neuroscience* 17(19): 7462-7470.
- Mapp PI, Terenghi G, Walsh DA, Chen ST, Cruwys SC, Garrett N, Kidd BL, Polak JM, Blake DR (1993) Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in the substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neuroscience* 57(4): 1091-1096.
- Markenson JA (1996) Mechanisms of chronic pain. *The American Journal of Medicine* 101 (Supplement 1A): 6S-18S.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3228-3232.
- McAdam BF, Mardini IA, Habib A, Burke A, Lawson JA, Kapoor S, FitzGerald GA (2000) Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 105: 1473-1482.
- McCarson KE, Krause JE (1994) NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced arthritis. *The Journal of Neuroscience* 14(2): 712-720.
- McMahon SB, Bennett DLH (1999) Trophic factors and pain. In: *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone pp: 105-128.
- McMahon SB, Jones NG (2004) Plasticity of pain signaling: role of neurotrophic factors exemplified by acid-induced pain. *J Neurobiol* 61(1): 72-87.
- Meller ST, Gebhart GF (1993) Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52: 127-136.
- Melzack R,Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL (2001) Central Neuroplasticity and Pathological Pain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 933: 157-174.
- Men trety D, Besson JM (1982) Electrophysiological characteristics of dorsal horn cells in rats with cutaneous inflammation resulting from chronic arthritis. *Pain* 13: 343-364.

- Mense S, Prabhakar NR (1986) Spinal termination of nociceptive afferent fibres from deep tissues in the cat. *Neurosci Lett* 66(2): 169-174.
- Merskey H, Bogduk N (1994) Classification of Chronic Pain. Descriptions of Chronic Pain Syndroms and Definitions of Pain Terms. Seattle: IASP Press
- Meyer P, Burkhardt H, Palombo-Kinne E, Gründer W, Bräuer R, Stiller KJ, Kalden JR, Becker W, Kinne RW (2000) 123I-antileukoprotease scintigraphy reveals microscopic cartilage alterations in the contralateral knee joint of rats with "monoarticular" antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 43(2): 298-310.
- Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Mennett DL, Yan Q, Priestley JV (1997) Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neuroscience* 17: 8476-8490.
- Minami T, Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1992) Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin F<sub>2α</sub> to conscious mice. *Pain* 50(2): 223-229.
- Minami T, Nishihara I, Uda R, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1994a) Characterization of EP-receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin E<sub>2</sub> to mice. *British Journal of Pharmacology* 112: 735-740.
- Minami T, Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1994b) Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin E<sub>2</sub> to conscious mice. *Pain* 57(2): 217-23.
- Minami T, Nishihara I, Sakamoto K, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1995) Blockade by ONO-NT-012, a unique prostanoid analogue, of prostaglandin E<sub>2</sub>-induced allodynia in conscious mice. *British Journal of Pharmacology* 115: 73-76.
- Minami T, Nakano H, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Ito S (2001) Characterization of EP receptor subtypes for prostaglandin E<sub>2</sub>-induced pain responses by use of EP<sub>1</sub> and EP<sub>2</sub> receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology* 133: 438-444.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M (2005) Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanisms of prostaglandins. *Mol Pain* 1:3.
- Muth-Selbach US, Tegeder I, Brune K, Geisslinger G (1999) Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E<sub>2</sub> release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology* 91: 231-239.
- Nakayama Y, Omote K, Namiki A (2002) Role of prostaglandin receptor EP<sub>1</sub> in the spinal dorsal horn in carrageenan-induced inflammatory pain. *Anesthesiology* 97: 1254-1262.

- Nakayama Y, Omote K, Kawamata T, Namiki A (2004) Role of prostaglandin receptor subtype EP1 in prostaglandin E2-induced nociceptive transmission in the rat spinal dorsal horn. *Brain Res.* 1010(1-2): 62-8.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structure, properties, and functions. *Physiol Rev* 79: 1193-1226.
- Narumiya S, FitzGerald GA (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J. Clin. Invest.* 108: 25-30.
- Nebe J, Vanegas H, Neugebauer V, Schaible HG (1997)  $\omega$ -agatoxin IVA, a P-type calcium channel antagonist, reduces nociceptive processing in spinal cord neurons with input from the inflamed but not from the normal knee joint – an electrophysiological study in the rat in vivo. *Eur J Neurosci* 9: 2193-2201.
- Negishi M, Sugimoto Y, Irie A, Narumiya S, Ichikawa A (1993) Two Isoforms of Prostaglandin E Receptor EP3 Subtype. *The Journal of Biological Chemistry* 268(5): 9517-9521.
- Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A (1995) Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1259(1): 109-119.
- Neugebauer V, Schaible HG (1988) Peripheral und spinal components of the sensitization of spinal neurons during an acute experimental arthritis. *Agents Actions* 25(3-4): 234-6.
- Neugebauer V, Schaible HG (1990) Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cat's knee. *J Neurophysiol* 64(1): 299-311.
- Neugebauer V, Lücke T, Schaible HG (1993) N-methyl-D-aspartat (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J. Neurophysiol.* 70: 1365-1377.
- Neugebauer V, Lücke T, Grubb B, Schaible HG (1994a) The involvement of N-methyl-D-aspartat (NMDA) and non-NMDA receptors in the responsiveness of rat spinal neurons with input from the chronically inflamed ankle. *Neuroscience Letters* 170: 237-240.
- Neugebauer V, Lücke T, Schaible HG (1994b) Requirement of metabotropic glutamat receptors for the generation of inflammation-evoked hyperexcitability in rat spinal cord neurons. *European Journal of Neuroscience* 6: 1179-1186.
- Neugebauer V, Schaible HG, Weiretter F, Freudenberger U (1994c) The involvement of substance P and neurokinin-1 receptors in the response of rat dorsal horn neurons to noxious but not to innocuous mechanical stimuli applied to the knee joint. *Brain Research* 666: 207-215.

- Neugebauer V, Weiretter F, Schaible HG (1995) Involvement of substance P and neurokinin-1 receptors in the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *Journal of Neurophysiology* 73(4): 1574-1583.
- Neugebauer V, Rümenapp P, Schaible HG (1996a) Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute inflammation. *Neuroscience* 71(4): 1095-1109.
- Neugebauer V, Rümenapp P, Schaible HG (1996b) The role of spinal neurokinin-2 receptors in the processing of nociceptive information from the joint and in the generation and maintenance of inflammation-evoked hyperexcitability of dorsal horn neurons in the rat. *European Journal of Neuroscience* 8: 249-260.
- Nicol GD, Klingberg DK, Vasko MR (1992) Prostaglandin E<sub>2</sub> increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *The Journal of Neuroscience* 12(5): 1917-1927.
- Nicol GD, Vasko MR, Evans AR (1997) Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *Am. J. Physiol.* 77: 167-176.
- Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A (1996) Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Molecular Pharmacology* 50(4): 1031-1037.
- Nishihara I, Minami T, Uda R, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1995) Effect of NMDA receptor antagonists on prostaglandin E<sub>2</sub>-induced hyperalgesia in conscious mice. *Brain Research* 677(1): 138-144.
- Oldfield S, Grubb BD, Donaldson LF (2001) Identification of a prostaglandin E2 receptor splice variant and its expression in rat tissues. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 63: 165-173.
- Panagides J, Landes MJ, Sloboda AE (1980) Destruction of articular cartilage by arthritic synovium in vitro: mechanism of breakdown and effect of indomethacin and prednisolone. *Agents Actions*. 10(1 Pt 2): 22-30.
- Patrignani P, Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, Cipollone F, Ganci A, Greminon C, Macclouf J (1994) Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271:1705-1712.
- Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Patrono C (1997) Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 48(4): 623-31.

- Patrignani P (2000) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, COX-2 and colorectal cancer. *Toxicology Letters* 112-113: 493-498.
- Pearson CM (1963) Experimental joint disease. Observations on adjuvant-induced arthritis. *Journal of Chronic Disease* 16(8): 863-864.
- Petersen M, Segond von Banchet G, Heppelmann B, Koltzenburg M (1998) Nerv growth factor regulates the expression of bradykinin binding sites on adult sensory neurons via the neutrophin receptor p75. *Neuroscience* 83: 161-168.
- Pezet S, Onteniente B, Grannec G, Calvino B (1999) Chronic pain is associated with increase TrkA immunoreactivity in spinoreticular neurons. *The Journal of Neuroscience* 19(13): 5482-5492.
- Proske U, Schaible HG, Schmidt RF (1988) Joint receptors and kinaesthesia. *Exp Brain Res* 72(2): 219-24.
- Rang HP, Bevan S, Dray A (1991) Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. *Br. Med. Bull.* 47: 534- 548.
- Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, Pahl A, Brune K, Narumiya S, Müller U, Zeilhofer HU (2005) Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *The Journal of Clinical Investigation* 115(3): 673-679.
- Resnick DK, Graham SH, Dixon CE, Marion DW (1998) Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 15(12): 1005-1013.
- Rice ASC, Farquhar-Smith WP, Nagy I (2002) Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66: 243-256.
- Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM (1997) SR 141716A, a cannabinoid receptor antagonist, produces hyperalgesia in untreated mice. *European Journal of Pharmacology* 319(2-3): R3-4.
- Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM (1998) Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *European Journal of Pharmacology* 345(2): 145-153.
- Riedel W, Neeck G (2001) Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Rheumatol* 60: 404-415.
- Robinson DR, McGuire MB, Levine L (1975) Prostaglandins in the rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 256: 318-329.
- Rusin KI, Bleakman D, Chard PS, Randic M, Miller RJ (1993) Tachykinins potentiate N-methyl-D-aspartat responses in acutely isolated neurons from the dorsal horn. *J Neurochem.* 60: 952-960.

- Saito Y, Kaneko M, Kirihaara Y, Kosaka Y, Collins JG (1995) Intrathecal prostaglandin E<sub>1</sub> produces a long-lasting allodynic state. *Pain* 63: 303-311.
- Sakai M, Minami T, Hara N, Nishihara I, Kitade H, Kamiyama Y, Okuda K, Takahashi H, Mori H, Ito S (1998) Stimulation of nitric oxide release from rat spinal cord by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Br. J. Pharmacol.* 123: 890-894.
- Salvemini D (1997) Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53: 576-582.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchrone A, et al. (2001) Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410: 471-475.
- Sandkühler J, Liu X (1998) Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *European Journal of Neuroscience* 10: 2476-2480.
- Sang N, Chen C (2006) Lipid Signaling and Synaptic Plasticity. *The Neuroscientist* 12(5): 425-434
- Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL (1992) In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *The Journal of Clinical Investigation* 89: 97-108.
- Schadrack J, Neto FL, Ableitner A, Castro-Lopes JM, Willoch F, Bartenstein P, Zieglgänsberger W, Tolle TR (1999) Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. *Neuroscience* 94(2): 595-605.
- Schaible HG, Schmidt RF (1983a) Activation of groups III and IV sensory units in medial articular nerve by lokal mechanical stimulation of knee joint. *J. Neurophysiol.* 49: 35-44.
- Schaible HG, Schmidt RF (1983b) Responses of fine medial articular nerve afferents to passive movements of knee joint. *J. Neurophysiol.* 49: 1118-1126.
- Schaible HG, Schmidt RF, Willis WD (1986) Responses of spinal cord neurones to stimulation of articular afferent fibres in the cat. *Journal of Physiology* 372: 575-593.
- Schaible HG, Schmidt RF, Willis WD (1987) Convergent inputs from articular, cutaneous and muscle receptors onto ascending tract cells in the cat spinal cord. *Exp Brain Res* 66(3): 479-88.
- Schaible HG, Schmidt RF (1988a) Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J. Neurophysiol.* 60: 2180-2195.
- Schaible HG, Schmidt RF (1988b) Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Physiol.* 403: 91-104.

Schaible HG (1990) Neurobiologische Grundlagen des Gelenkschmerzes. TW Neurologie und Psychiatrie. G. Braun Verlag Zeitschriften und Medizinische Bücher Karlsruhe.

Schaible HG, Neugebauer V, Cervero F, Schmidt RF (1991) Changes in tonic descending inhibition of spinal neurons with articular input during the development of acute arthritis in the cat. *Journal of Neurophysiology* 66(3): 1021-1032.

Schaible HG, Grubb BD (1993) Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55(1): 5-54

Schaible HG, Schmidt RF (1996) Neurophysiology of chronic inflammatory pain: electrophysiological recordings from spinal cord neurons in rats with acute and chronic unilateral inflammation at the ankle. In: Carli G, Zimmermann M (eds.) *Towards the Neurobiology of chronic pain. Progress of Brain Research* vol. 110. Amsterdam: Elsevier: 167-76.

Schaible HG (1997a) Neurobiologische Grundlagen der Schmerzhaftigkeit funktionsgestörter Gelenke. *Manuelle Medizin* 35: 77-81.

Schaible HG (1997b) Neurophysiology of nociception and pain reactions in inflammatory joint diseases. *Rev. Rheum. [Engl. Ed.]* 64 (10, Suppl.): 144S-145S.

Schaible HG (1998) The neurophysiology of pain. In: Maddison PJ, Isenberg DA, Woo P, Glass DN (eds.) *Oxford Textbook of Rheumatology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford University Press. USA.

Schaible HG, Vanegas H (2000) How do we manage chronic pain? *Bailliere's Clinical Rheumatology* 14(4): 797-811.

Schaible HG, Ebersberger A, Segond von Banchet G (2002) Mechanisms of pain in arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 966: 343-354.

Schaible HG, Richter F (2004) Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg* 389: 237-243

Schaible HG, Schmidt RF (2007) Nozizeption und Schmerz. In: Schmidt RF, Lang F (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Schepelmann K, Meßlinger K, Schaible HG, Schmidt RF (1992) Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin I<sub>2</sub>. *Neuroscience* 50(1): 237- 247.

Schmid A, Thierauch KH, Schleuning WD, Dinter H (1995) Splice variants of the human EP3 receptor for prostaglandin E2. *Eur J Biochem* 228(1): 23-30.



Schmidt H, Geisslinger G (2001) Selektive Cyclooxygenase-2-Hemmer. Schmerz 15: 207-219

Schurigt U, Stopfel N, Hückel M, Pfirschke C, Wiederanders B, Bräuer R (2005) Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 7(1): 174-188.

Schwab JM, Beiter T, Linder JU, Laufer S, Schulz JE, Meyermann R, Schlüsener HJ (2003) COX-3: a virtual pain target in humans? FASEB J. 17(15): 2174-2175.

Seidel K, Hamza M, Ates M, Gühring H (2003) Flurbiprofen inhibits capsaicin induced calcitonin gene related peptide release from rat spinal cord via an endocannabinoid dependent mechanism. Neuroscience Letters 338: 99-102.

Segond von Banchet G, Petrow PK, Bräuer R, Schaible HG (2000) Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. Arthritis Res 2: 424-427.

Segond von Banchet G, Scholze A, Schaible HG (2003) Prostaglandin E<sub>2</sub> increases the expression of the neurokinin<sub>1</sub> receptor in adult sensory neurons in culture: a novel role of prostaglandins. British Journal of Pharmacology 139, 672-680.

Segond von Banchet G, Scholze A, Schaible HG (2003) Prostaglandin E<sub>2</sub> increases the expression of the neurokinin<sub>1</sub> receptor in adult sensory neurons in culture: a novel role of prostaglandins. British Journal of Pharmacology 139: 672-680.

Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 12013-12017.

Seybold VS, Jia YP, Abrahams LG (2003) Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. Pain 105(1-2): 47-55.

Sluka KA, Westlund KN (1992) An experimental arthritis in rats: dorsal horn aspartate and glutamate release in the dorsal horn. Neurosci. Lett. 145: 141-144.

Sluka KA, Westlund KN (1993) An experimental arthritis model in rats: the effect of NMDA and non-NMDA antagonists on aspartate and glutamate release in the dorsal horn. Neurosci. Lett. 149: 99-102.

Sluka Ka, Willis WD (1997) The effects of G-protein and protein kinase inhibitors on the behavioral response of rats to intradermal injection of capsaicin. Pain 71(2): 165-178.

Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC (1998) Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13313-8.

Smith JB, Willis AL (1971) Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol* 231: 235.

Sorkin LS, Westlund KN, Sluka KA, Dougherty PM, Willis WD (1992) Neuronal changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time-course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. *Brain Res. Rev.* 17: 39-50.

Sorkin LS (1993) IT ketolorac blocks NMDA-evoked spinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and thromboxane B<sub>2</sub> (TBXB<sub>2</sub>). *Anesthesiology* 79 A 908.

Southall MD, Michael RL, Vasko MR (1998) Intrathecal NSAIDS attenuate inflammation-induced neuropeptide release from rat spinal cord slices. *Pain* 78: 39-48.

Southall MD, Bolyard LA, Vasko MR (2002) Twenty-four hour exposure to prostaglandin downregulates prostanoid receptor binding but does not alter PGE<sub>2</sub>-mediated sensitization of rat sensory neurons. *Pain* 96(3): 285-96.

Staniaszek LE, Norris LM, Kendall DA, Barrett DA, Chapman V (2010) Effects of COX-2 inhibition on spinal nociception: the role of endocannabinoids. *Br J Pharmacol* 160(3): 669-676.

Steinberg J, Tsukamoto S, Sledge CB (1979) A tissue culture model of cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. III. Effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum.* 22(8): 877-885.

Steinberg JJ, Hubbard JR, Sledge CB (1987) Chondrocyte-mediated breakdown of cartilage. *J Rheumatol.* 14: 55-58.

Steinmeyer J (2000) Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res* 2: 379-385.

Stiller RU, Grubb BD, Schaible HG (1993) Neurophysiological evidence for increased kappa opioidergic control of spinal cord neurons in rats with unilateral inflammation at the ankle. *European Journal of Neuroscience* 5: 1520-1527.

Stock JL, Shinjo K, Burkhardt J, Roach M, Taniguchi K, Ishikawa T, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, McNeish JD, Audoly LP (2000) The prostaglandin E<sub>2</sub> EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J. Clin. Invest.* 107: 325-331.

Svensson CI, Yaksh TL (2002) The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 553-583.

Tazawa R, Xu XM, Wu KK, Wang LH (1994) Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promotor of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 203(1): 190-199.

Tegeder I, Niederberger E, Israr E, Gühring H, Brune K, Euchenhofer C, Grösch S, Geisslinger G (2001) Inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation by R- and S-Flurbiprofen. *FASEB J.* 15: 2-4.

Thomas C (1993) Knochen und Gelenke. In: Thomas C (Hrsg.) *Makropathologie Lehrbuch und Atlas für die Kurse der allgemeinen und speziellen Pathologie*. 8. Auflage. Stuttgart, New York: Schattauer-Verlag.

Tonai T, Taketani Y, Ueda N, Nishisho T, Ohmoto Y, Sakata Y, Muraguchi M, Wada K, Yamamoto S (1999) Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. *J. Neurochem.* 72: 302-309.

Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A (2002) Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 68-69: 535-556.

Turnbach MW, Randich A (2002) The role of spinal neurokinin-1 and glutamate receptors in hyperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E(2) or zymosan in the rat. *Pain* 97(1-2): 127-137

Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O (1990) Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D2, E2, or F2 alpha to conscious mice. *Brain Res* 510(1): 26-32.

Ueno A, Matsumoto H, Naraba H, Ikeda Y, Ushikubi F, Matsuoka T, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Oh-ishi S (2001) Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochem Pharmacol.* 62(2): 157-60.

Urban MO, Gebhart GF (1999) Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7687-7692.

van den Berg WB, van Beusekom HJ, van de Putte LB, Zwarts WA, van der Sluis M (1982) Antigen handling in antigen-induced arthritis in mice: an autoradiographic and immunofluorescence study using whole joint sections. *American Journal of Pathology* 108: 9-16.

van den Berg WB, van de Putte LB, Zwarts WA, Joosten LA (1984) Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 74: 1850-1859.

Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231:232-235.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 97-120.

Vanegas H, Schaible HG (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64(4): 327-63.

Vanegas H, Schaible HG (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews* 46: 295-309.

Vasko MR, Campbell WB, Wait KJ (1994) Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances Bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci* 14: 4987-4997.

Vasko MR (1995) Prostaglandin-induced neuropeptide release from spinal cord. *Prog Brain Res* 104: 367-380.

Vasquez E, Bär KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible HG (2001) Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *J. Neurosci.* 21(22): 9001-9008.

Vetter G, Geisslinger G, Tegeder I (2001) Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain* 92: 213-218.

von Korff M, Dunn KM (2008) Chronic Pain Reconsidered. *Pain.* 138(2): 267-276.

Wallace JL, Bak A, McKnight W, Asfaha S, Sharkey KA, MacNaughton WK (1998) Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology* 115: 101-109.

Wallace JL (1999) Distribution and Expression of Cyclooxygenase (COX) Isoenzymes, Their Physiological Roles, and the Categorization of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *The American Journal of Medicine* 107(6A): 11S-16S.

Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7563-7568.

Warner TD, Vojnovic I, Giuliano F, Jimenez R, Bishop-Bailey D, Mitchell JA (2004) Cyclooxygenases 1, 2 and 3 and the production of prostaglandin I<sub>2</sub>: investigating the activities of acetaminophen and cyclooxygenase-2-inhibitors in rat tissues. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310: 642-647.

- Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa a (1993) Cloning and axpression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *The Journal of Biology and Chemistry* 268(27): 20175-20178.
- Weber A, Ni J, Ling KH, acheampong A, Tang-Liu DD, Burk R, Cravatt BF, Woodward D (2004) Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analyzed by HPLC with tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 45(4): 757-763.
- Willingale HL, Gardiner NJ, McLymont N, Giblett S, Grubb BD (1997) Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their distribution to the development of neuronal hyperexcitability. *British Journal of Pharmacology* 122: 1593-1604.
- Wittenberg RH, Willburger RE, Kleemeyer KS, Peskar BA (1993) In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. *Athritris Rheum.* 36(10): 1444-1450.
- Woolf CJ, Mannion RJ, Neumann S (1998) Null Mutations Lacking Substance: Elucidation Pain Mechanisms by Genetic Pharmaology. *Neuron* 20: 1063-1066.
- Xian-Min Y, Mense S (1990) Response properties and decending control of rat dorsal horn neurons with deep receptive fields. *Neuroscience* 39(3): 823-831.
- Yaksh TL, Hua XY, Kalcheva I, Nozaki-Taguchi N, Marsala M (1999) The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7680-7686.
- Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC (2001) The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E<sub>2</sub> is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *The Journal of Neuroscience* 21(16): 5847-5853.
- Yamagata K, Andreason KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11(2): 371-86
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, (1996) Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a selective inhibitor. *Brain Research* 739(1-2): 104-110.
- Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N (1997) Role of spinal cyclooxygenase (COX)-2 on thermal hyperalgesia evoked by carageenan injection in the rat. *NeuroReport* 8(9-10): 2179-2182.
- Yamamoto T, Sakashita Y (1998) COX-2 inhibitor prevents the development of hyperalgesia induced by intrathecal NMDA or AMPA. *Neuroreport* 9(17): 3869- 3873.

Yamamoto H, Maruyama T, Sakata K, Koketsu M, Kobayashi M, Yoshida H, Seki A, Tani K, Maruyama T, Kondo K, Ohuchida S (1999) Novel foer selective agonists for prostaglandin receptor subtypes. Abtracts/ Prostaglandins & other Lipid Mediators 59: 1-235.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, (2002) The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. Anesth Analg 94(4): 962-967.

Yang LC, Marsala M, Yaksh TL (1996) Characterization of time course of spinal aminoacids, citrulline and PGE<sub>2</sub> release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. Pain 67: 345-354.

Zacharowski K, Olbrich A, Piper J, Hafner G, Kondo K, Thiemermann C (1999) Selective Activation of the Prostanoid EP(3) Receptor Reduces Myocardial Infarct Size in Rodents. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2141-2147.

Zeilhofer HU, Brune K (2006) Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. Trends Pharmacol Sci. 27(9): 467-74

Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnel D (2003) Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. Eur J Neurosci 17: 2750-4.

Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K, Isakson PC (1997) Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. J Pharmacol Exp Ther 283(3): 1069-75.

Zhao Z, Chen SR, Eisenach JC, Busija DW, Pan HL (2000) Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. Neuroscience 97(4): 743-748.

Zimmermann M (2004) Neuronale Mechanismen der Schmerzchronifizierung. Orthopäde 33: 515-524.

Zhu X, Conklin D, Eisenach JC (2003) Cyclooxygenase-1 in spinal cord plays an important role in postoperative pain. Pain 104: 15-23.

Internetreferenzen:

I: [www.gerac.de/download/7Zenz.pdf](http://www.gerac.de/download/7Zenz.pdf) (Stand: November 2005)

II: [www.schmerzliga.de/download/Dossier\\_Schmerzliga.pdf](http://www.schmerzliga.de/download/Dossier_Schmerzliga.pdf) (Stand: Januar 2013)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synthesewege der Eicosanoide.....	14
Abbildung 2: COX-1 und COX-2.....	30
Abbildung 3: Schaltbild des Meßstandes.....	40
Abbildung 4: Darstellung der standardisierten Reizapplikation an Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote.....	41
Abbildung 5: akut entzündetes Kniegelenk .....	48
Abbildung 6: chronisch entzündetes Kniegelenk .....	48
Abbildung 7: Einfluss von ONO-AE3-240 und der verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	50
Abbildung 8: Einfluss der verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 21 nach Arthritisinduktion .....	52
Abbildung 9: Einfluss von ONO-AE-248 am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	54
Abbildung 10: Einfluss von ONO-AE-248 am Tag 21 nach Arthritisinduktion.....	56
Abbildung 11: Einfluss von ONO-AE3-240 am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	58
Abbildung 12: Einfluss von ONO-AE3-240 und der verschiedenen EP-Rezeptor-Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	59
Abbildung 13: Einfluss von Diclofenac und NS-398 am Tag 1 nach Arthritisinduktion.....	62
Abbildung 14: Einfluss von Diclofenac und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	64
Abbildung 15: Einfluss von Diclofenac/ Indomethacin und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion .....	65
Abbildung 16: Einfluss von Indomethacin, NS-398 und Methanandamid am Tag 3 nach Arthritisinduktion .....	66
Abbildung 17: Einfluss von Diclofenac und NS-398 am Tag 21 nach Arthritisinduktion.....	68



**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Funktion der COX-Isoformen .....	16
Tabelle 2:	Prostaglandinrezeptoren .....	22
Tabelle 3:	Testprotokolle der verschiedenen Prostaglandinrezeptoragonisten und des EP <sub>3</sub> - Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240.....	43
Tabelle 4:	Testprotokolle des EP <sub>3</sub> -Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 und des EP <sub>3</sub> - Rezeptor-Antagonisten ONO-AE3-240.....	43
Tabelle 5:	Testprotokolle der unselektiven COX-Hemmer Diclofenac und Indomethacin und des selektiven COX-Hemmer NS-398.....	44
Tabelle 6:	Rezeptive Felder der abgeleiteten Neurone.....	47
Tabelle 7:	Einteilung der Neurone bezüglich Entzündungsstadium, Neuronentiefe und Art.....	47
Tabelle 8:	Vergleich Kniegelenksumfänge .....	48
Tabelle 9:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter den verschiedenen EP-Rezeptor- Agonisten am Tag 3 nach Arthritisinduktion .....	51
Tabelle 10:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter den verschiedenen EP-Rezeptor- Agonisten am Tag 21 nach Arthritisinduktion .....	52
Tabelle 11:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter ONO-AE-248 am Tag 3 nach Arthritisinduktion .....	54
Tabelle 12:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter ONO-AE-248 am Tag 21 nach Arthritisinduktion .....	56
Tabelle 13:	Antwortverhalten von 2 Neuronen unter ONO-AE3-240 am Tag 3 nach Arthritisinduktion .....	58
Tabelle 14:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter ONO-AE3-240 am Tag 3 nach Arthritisinduktion .....	60
Tabelle 15:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter Diclofenac und NS-398 am Tag 1 nach Arthritisinduktion.....	62
Tabelle 16:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter Diclofenac und NS-398 am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	65
Tabelle 17:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter Indomethacin, NS-398 und Methanandamid am Tag 3 nach Arthritisinduktion.....	67
Tabelle 18:	Antwortverhalten spinaler Neurone unter Diclofenac und NS-398 am Tag 21 nach Arthritisinduktion.....	68

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich diese Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible

PD Dr. rer. nat. Andrea Ebersberger

Dr. med. Alejandro Telleria-Diaz,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Leistungen erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erlangen, den 06.08.2015

Katharina Nowak

## **Danksagung**

Mein vornehmlicher Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Schaible für das Überlassen des Promotionsthemas sowie seiner hilfreichen und konstruktiven Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Keine Selbstverständlichkeit sind jedoch seine unendliche Geduld und Bereitwilligkeit, mich auch noch nach geraumer Zeit weiter zu unterstützen, um diese Arbeit zum Abschluss bringen zu können. Dafür möchte ich mich außerordentlich bei ihm bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Andrea Ebersberger für ihre Hilfe bei der Erstellung der Grafiken sowie der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Ohne sie wären diese so nicht zustande gekommen. Herzlichen Dank.

Außerdem bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. Alejandro Telleria-Diaz für die professionelle Durchführung der Versuche, die geistreiche Unterhaltung zwischendurch und die herzliche Aufnahme in seine Familie.

Frau Cuny gewährt ebenso ein großer Dank für die Vorbereitung der Versuche, Bereitstellung der zahlreichen Utensilien sowie ihrer immer freundlichen und hilfsbereiten Art bei der Einarbeitung im Labor sowie Klärung so einiger Ungereimtheiten.

Ebenso bedanke ich mich herzlichst bei Kerstin Zölfl für ihre unermüdliche und besonders stressresistente Hilfe bei der technischen Überarbeitung des Scripts.

Gleichwohl gebührt diesbezüglich auch meinem lieben Bruder großer Dank für seine tatkräftige Unterstützung in mitunter mühevoller Kleinstarbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden Rosi, Mela, Anne und Thomas für ihre stetige Aufmunterung und ihre ganz besondere Freundschaft bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, mir immer jeglichen Freiraum und Unterstützung gewährt zu haben und für ihre Liebe: ihr habt an den richtigen Stellen geschnitten und die richtigen wachsen lassen.